

---

# Einfluss von Typ I IFN auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Berit Neumann  
aus Blankenburg/Harz

---

1. Referent: Privatdozent Dr. Gerhard Gross  
2. Referent: Professor Dr. Martin Korte  
eingereicht am: 14.09.2011  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 08.12.2011

Druckjahr 2011

---



## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Tagungsbeiträge**

Neumann B, Ksienzyk A, Hauser H, Kröger A. Potential crosstalk between IFN- and TCR signaling. (Poster) *Research School for Infection Biology PhD Symposium*, Braunschweig (2008)

Neumann B, Ksienzyk A, Hauser H, Kröger A. Type I IFNs exert negative effects on CD8<sup>+</sup> T cells. (Poster) *Research School for Infection Biology PhD Symposium*, Braunschweig (2009)

Neumann B, Ksienzyk A, Hauser H, Kröger A. Type I IFNs exert negative effects on CD8<sup>+</sup> T cells (Poster). *Summer School Helmholtz International Research School for Infection Biology*, Rügen (2010)

Crosstalk between TCR- and IFN-signaling. (Vortrag) SYBILLA Workshop Imaging applications to Systems Biology, Magdeburg (2010)

Type I IFNs impair early and late events in CD8<sup>+</sup> T cell activation. (Vortrag) *Research School for Infection Biology PhD Symposium*, Braunschweig (2010)



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>2</b>
2.1 Das Interferon-System	2
2.1.1 Typ I IFN	3
2.1.2 Typ II und Typ III IFN	5
2.1.3 IFN-induzierte Signalwege	5
2.2 CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	8
2.2.1 Die Aktivierung von T-Zellen	8
2.2.2 Expansion und Ausbildung von Effektorfunktionen	10
2.2.3 Differenzierung zu T-Gedächtniszellen	11
2.2.4 Periphere Toleranzmechanismen	12
2.2.5 Der T-Zell-Rezeptor-Signalweg	13
2.3 Effekte von Typ I IFN auf CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	19
2.4 Zielsetzung	21
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>22</b>
3.1 Einfluss von Typ I IFN auf die TZR-Stimulation naiver CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	22
3.2 Der Einfluss von Typ I IFN auf die TZR-induzierte Proliferation von naiven CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	24
3.2.1 Typ I IFN inhibiert die Proliferation von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	24
3.2.2 Geringe Mengen IFN- $\beta$ haben keinen Einfluss auf die Proliferation von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	26
3.2.3 Einfluss von Zeitpunkt und Dauer einer IFN-Stimulation auf die Proliferation von T-Zellen	27
3.2.4 Typ I IFN zeigt keine negativen Effekte nach TZR- und Co-Rezeptor-Stimulation	30
3.2.5 Typ I IFN inhibiert die Proliferation von T-Zellen nach suboptimaler TZR-Stimulation	31
3.3 Einfluss von Typ I IFN auf das Überleben von T-Zellen	32
3.4 Einfluss von Typ I IFN auf die Effektorfunktionen von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	34
3.4.1 Typ I IFN inhibiert die Expression von IFN- $\gamma$ und Granzym B	34
3.4.2 Geringere Expression von FasL & TRAIL nach IFN-Stimulation	36
3.4.3 IFN-vorstimierte T-Zellen zeigen verminderte Zytotoxizität	37
3.5 Einfluss von Typ I IFN auf den Aktivierungs- und Differenzierungszustand von T-Zellen	39
3.5.1 Typ I IFN hat keinen negativen Einfluss auf die Expression des frühen Aktivierungsmarker CD69	39
3.5.2 Die Expression der Aktivierungsmarker CD62L und CD25 wird durch Typ I IFN nicht beeinflusst	42

3.5.3	Einfluss von Typ I IFN auf die Differenzierung zu CD44 <sup>hi</sup> T-Gedächtniszellen .....	43
3.6	Einfluss von Typ I IFN auf IL-2 .....	45
3.6.1	Typ I IFN hemmt die Induktion und Produktion von IL-2 .....	45
3.6.2	Die IFN-induzierte Inhibition der T-Zell-Proliferation kann durch externes IL-2 aufgehoben werden .....	47
3.7	Der Einfluss von Typ I IFN auf den TZR-Signalweg .....	48
3.7.1	Der Kalzium-Signalweg .....	48
3.7.2	Typ I IFN beeinflusst TZR-induzierte Signalmoleküle .....	57
3.8	Veränderte Geninduktion nach IFN- und TZR-Stimulation .....	60
3.8.1	Einfluss von Typ I IFN auf TZR-induzierte Gene .....	62
3.8.2	Typ I IFN induziert keine Toleranz-Mechanismen .....	66
3.8.3	Einfluss einer TZR-Stimulation auf IFN-induzierte Gene .....	69
3.9	Einfluss von Typ I IFN auf CD8 <sup>+</sup> T-Zellen nach TZR-Stimulation <i>in vivo</i> .....	71
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>78</b>
4.1	Typ I IFN inhibiert die Proliferation von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	78
4.2	Der Einfluss von Typ I IFN auf die Aktivierung, Differenzierung und Effektorfunktion von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	81
4.3	„Crosstalk“ zwischen TZR- und IFN-induzierten Signalwegen .....	83
4.4	Einfluss des „Crosstalks“ zwischen IFN- und TZR-Signalwegen auf die Geninduktion .....	86
4.5	Relevanz der beobachteten IFN-Effekte .....	89
<b>5.</b>	<b>Material &amp; Methoden .....</b>	<b>91</b>
5.1.	Geräte und Chemikalien .....	91
5.1.1	Geräte .....	91
5.1.2	Chemikalien .....	92
5.2	Zellkulturmaterialien .....	92
5.3	Computerprogramme .....	92
5.4	Sterilisation .....	93
5.5	Zellkulturmedien und Zelllinien .....	93
5.5.1	Verwendete Zelllinien .....	93
5.5.2	Medien und Lösungen .....	93
5.5.3	Kultivierung von Zellen .....	94
5.6	Arbeiten mit isolierten murinen Immunzellen .....	94
5.6.1	Isolierung von Zellen aus der Milz .....	94
5.6.2	Isolation von Zellen aus Lymphknoten .....	95
5.6.3	Aufreinigung von T-Zellen mittels magnetischer Separation .....	95
5.6.4	Stimulation von murinen T-Zellen <i>in vitro</i> .....	96
5.6.5	CFSE-Proliferationsassay .....	97
5.6.6	<i>In vitro</i> CTL-Assay .....	97
5.7	Durchflusszytometrie (FACS) zur Analyse von Zellen und Sortierung von Zellen ..	98
5.7.1	Antikörper für Durchflusszytometrie zur Analyse von Zellen und Sortierung von Zellen .....	98

5.7.2	Durchflusszytometrie und Zell-Sortierung.....	99
5.7.3	Analyse von intrazellulären Zytokinen .....	100
5.7.4	Messung der Kalzium-Mobilisierung mittels Durchflusszytometrie .....	100
5.8	RNA-Analysen .....	101
5.8.1	Isolierung von Gesamt-RNA.....	101
5.8.2	RT-PCR.....	102
5.8.3	Quantitative Real-Time PCR .....	102
5.8.4	Microarray-Analysen .....	103
5.9	Proteinanalytik.....	103
5.9.1	Zellaufschluss.....	103
5.9.2	Proteinbestimmung (BCA-Assay).....	104
5.9.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	104
5.9.4	Western Blot.....	105
5.10	In vivo-Versuche .....	107
5.10.1	Verwendete Maus-Linien .....	107
5.10.2	<i>In vivo</i> -Modell .....	107
5.10.3	<i>In vivo</i> CTL (Cytotoxic T cell) Assay .....	108
5.11	Statistische Analysen.....	109
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>110</b>
<b>7.</b>	<b>Appendix.....</b>	<b>119</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	119
7.2	Abkürzungen .....	121
7.3	Danksagung .....	125

## Lebenslauf

## 1. Zusammenfassung

Typ I IFN gehört zur ersten Abwehrlinie des Körpers nach Infektionen. Neben der direkten antiviralen Wirkung auf infizierte Zellen, wirkt es auf Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Die Wirkung von Typ I IFN auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die als Teil der adaptiven Immunantwort infizierte Zellen eliminieren, ist widersprüchlich. Zum einen kann Typ I IFN die Immunantwort unterstützen, zum anderen übt IFN negative Effekte auf CD8<sup>+</sup> T Zellen aus. Wie diese vielfältigen Wirkungen zustande kommen ist bisher unklar. Sowohl die Bindung von Typ I IFN an den entsprechenden Rezeptor als auch eine Stimulation des T-Zell-Rezeptors induzieren Signalkaskaden. Es sollte daher untersucht werden, welchen Einfluss die Signalkaskaden aufeinander ausüben, ob es einen „Crosstalk“ zwischen den Signalkaskaden gibt und welche Konsequenzen dies für die Aktivierung, Differenzierung und Effektorfunktion von T-Zellen hat. Um dies näher zu untersuchen, wurden OT-I T-Zellen TZR-spezifisch stimuliert und der Einfluss einer IFN- $\beta$ -Stimulation untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass Typ I IFN abhängig von Zeitpunkt und Dauer der Stimulation Proliferation und Effektorfunktion von Antigen-stimulierten T-Zellen inhibiert, während Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen nicht beeinflusst werden. Typ I IFN inhibiert die Induktion von IL-2, was ursächlich für die verminderte Proliferation ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Typ I IFN Moleküle der T-Zell-Rezeptor-Signalkaskade beeinflusst. Der Kalzium-Signalweg, der Ras/MAPK-Signalweg sowie die Aktivierung von NF $\kappa$ B werden durch Typ I IFN inhibiert, während die MAP-Kinasen JNK und p38 nicht beeinflusst werden. Geninduktionsanalysen zeigen, dass Typ I IFN zu einer verminderten Induktion einer Vielzahl T-Zell-Rezeptor-induzierter Gene führt, jedoch auch IFN-induzierte Gene durch eine T-Zell-Rezeptor-Stimulation vermindert induziert werden.

Insgesamt zeigen die Daten, dass ein „Crosstalk“ zwischen T-Zell-Rezeptor- und Typ I IFN-induzierten Signalwegen existiert und in Folge dessen T-Zell-Funktionen beeinflusst werden.

## 2. Einleitung

Auf Infektionen mit Pathogenen ist die erste Antwort des Immunsystems die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen. Diese Moleküle aktivieren und rekrutieren Immunzellen der angeborenen Immunabwehr, wie z.B. Neutrophile, Makrophagen, Natürliche Killer (NK)-Zellen und Dendritische Zellen (DCs). Zusammen mit den unmittelbaren Wirkungen der Zytokine auf Zellen führt dies zu effektiven Immunantworten an der Infektionsstelle. Die angeborene Immunabwehr ist nicht pathogenspezifisch, hängt aber von Wechselwirkungen zwischen pathogenen und körpereigenen Faktoren ab. Ziel der angeborenen Immunantwort ist es, das Pathogen zu eliminieren oder das weitere Ausbreiten einer Infektion zu verhindern bis diese durch die adaptive Immunantwort bekämpft werden kann. Zellen der adaptiven Immunantwort, wie B- und T-Zellen, können hingegen pathogenspezifisch eine Infektion bekämpfen, indem infizierte Zellen erkannt und gezielt getötet werden. Zusätzlich ist das angeborene Immunsystem in der Lage die adaptive Immunabwehr zu regulieren, indem sekretierte Zytokine die Entwicklung naiver T-Zellen in verschiedene Subtypen beeinflussen. Diese können wiederum durch die Produktion von Zytokinen gezielt Immunantworten induzieren. Die Regulierung des Immunsystems ist von großer Bedeutung, da nicht-regulierte oder nur unzureichend induzierte Immunantworten schwere Erkrankungen, wie chronische Infektionen oder Autoimmunerkrankungen, verursachen können.

### 2.1 Das Interferon-System

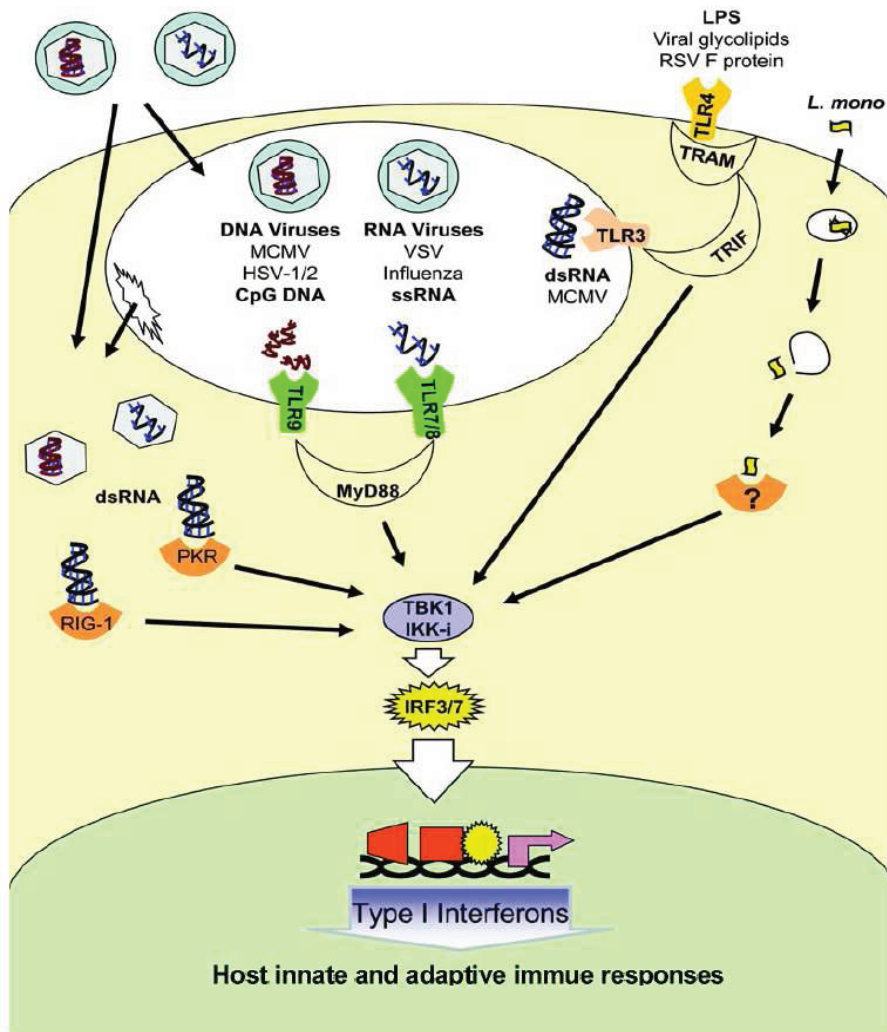
Interferone gehören zu den Zytokinen, die nach viralen Infektionen, aber auch in Folge von Entzündungen oder bakteriellen Infektionen produziert werden. Sie wurden bereits 1957 aufgrund ihrer antiviralen Funktion durch Lindenmann und Isaacs entdeckt<sup>1</sup>. Neben

antiviralen Aktivitäten vermitteln sie die Induktion von antitumoralen und immunmodulatorischen Effekten. Interferone können anhand ihrer Sequenzhomologien, der Bindung an entsprechende Rezeptoren sowie ihrer biologischen Aktivität in Typ I, II und III Interferon (IFN) unterteilt werden.

### 2.1.1 Typ I IFN

Typ I IFN (IFN- $\alpha$ s, - $\beta$ , - $\omega$ , - $\epsilon$ , - $\kappa$ ) wird nach viralen oder mikrobiellen Infektionen in großen Mengen von vielen Zellen, hauptsächlich jedoch von plasmazytoiden DCs (pDCs) produziert<sup>2</sup>. Virale oder bakterielle Bestandteile werden durch „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs) erkannt. Zu diesen gehören Mitglieder der „Retinoic acid Inducible Gene-1“ (RIG-I)-Familie und die Toll-like Rezeptoren TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 und TLR9. RIG-I, die TLRs 3, 4, 7, 8 und 9 sowie zusätzliche Proteine, wie die „dsRNA-dependent protein kinase“ (PKR), induzieren daraufhin die Produktion von Typ I IFN über die Aktivierung der „TANK-Binding Kinase-1“ (TBK) und der „inducible I $\kappa$ B Kinase“ (IKK-i). TLR9 und TLR7 benötigen das Adapter-Protein „Myeloid Differentiation Factor-88“ (MyD88), während TLR4 „Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$  (TRIF) benötigt, um Signale zu übermitteln. TBK-1 und IKK-i aktivieren daraufhin die „Interferon Regulatory Factors“ IRF3 und IRF7, die die Transkription von Typ I IFN induzieren<sup>3</sup> (*Abbildung 1*).





### Abbildung 1 Signalwege, die zur Produktion von Typ I IFN führen

Nach einer Infektion werden virale oder bakterielle Bestandteile durch PRRs und Effektor-Proteine erkannt. dsRNA im Zytoplasma wird durch RIG-I und PKR erkannt. Virale DNA bzw. RNA in Endosomen wird durch die Toll-like Rezeptoren TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 erkannt. TLR4 erkennt gram-negative Bakterien anhand von LPS, virale Glykolipide und das F-Protein vom „Respiratory Syncytial Virus“ (RSV). Listerien, die über Phagozytose in Zellen gelangen, werden über bisher nicht bekannte PRRs erkannt. Über die Aktivierung von TBK-1 und IKK- $\epsilon$  werden die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 aktiviert und die Transkription von Typ I IFN induziert. Typ I IFN hat verschiedene Effekte auf die angeborene und adaptive Immunantwort. (Perry *et al.* 2005)

Typ I IFN spielt über direkte und indirekte antivirale Effekte eine wichtige Rolle in der Abwehr einer Vielzahl verschiedener Viren. Zusätzlich führt es zur Aktivierung von Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, wie NK-Zellen, DCs und Makrophagen<sup>4-6</sup>. Durch seinen Einfluss auf die Reifung von DCs sowie deren Potential, Antigene zu

präsentieren, wird Typ I IFN auch als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort betrachtet. Alle Typ I IFN-Subtypen binden an den Typ I IFN-Rezeptor (IFNAR), der von den meisten Zelltypen exprimiert wird<sup>7,8</sup>.

### 2.1.2 Typ II und Typ III IFN

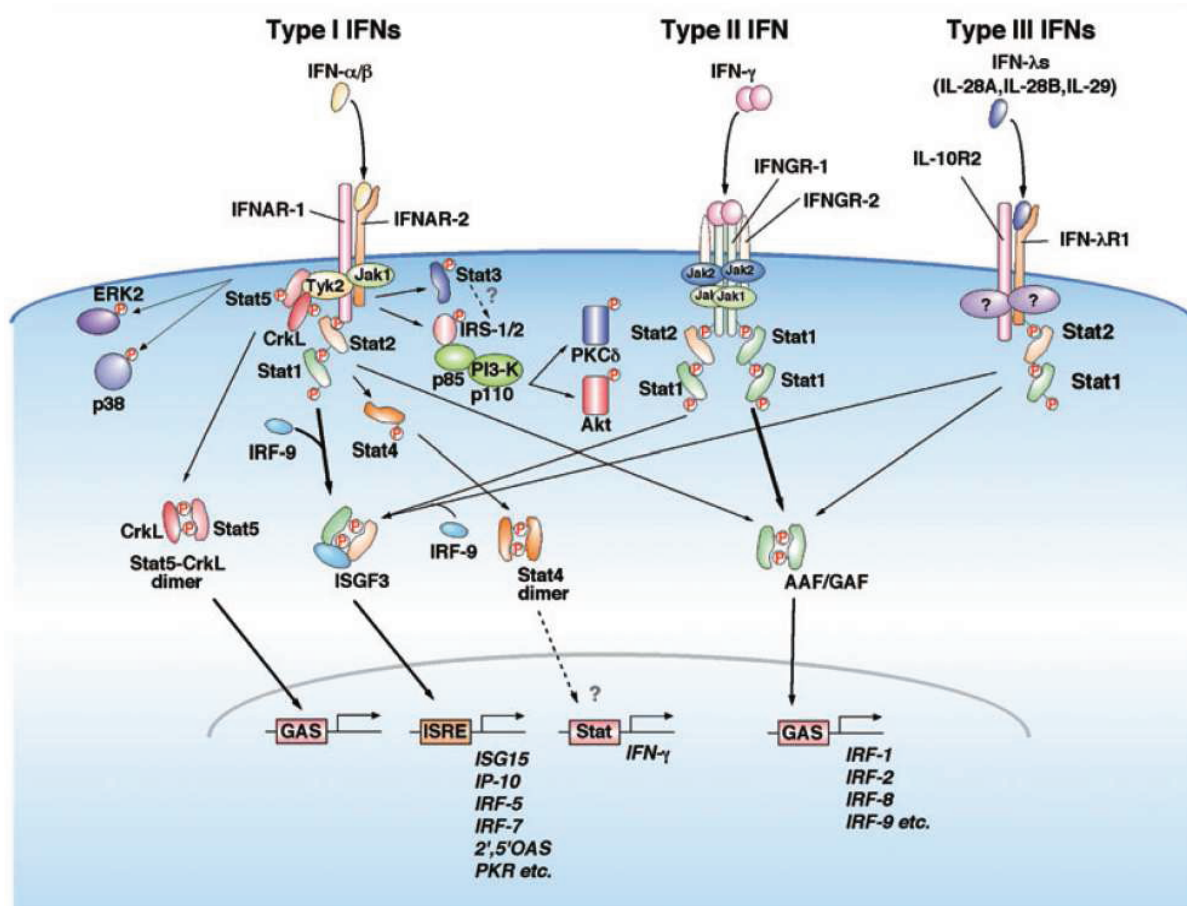
Zu den Typ II IFN gehört ausschließlich IFN- $\gamma$ , welches ebenfalls antivirale Wirkungen über die Bindung an den entsprechenden Rezeptor, dem IFN- $\gamma$ R (IFNGR), vermittelt<sup>4,9,10</sup>. IFN- $\gamma$  wird von aktivierten T- oder NK-Zellen produziert und ist notwendig für die Aktivierung von Makrophagen sowie die Differenzierung zu CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen<sup>10</sup>.

Die Mitglieder der IFN- $\lambda$ - bzw. Interleukin (IL) 28/29-Familie stellen die dritte Gruppe, die Typ III IFN, dar<sup>11,12</sup>. Wie Typ I IFN werden sie nach viralen Infektionen produziert und zeigen antivirale Wirkungen. Sie unterscheiden sich jedoch strukturell von Typ I IFN und binden einen spezifischen Rezeptor, der aus dem IFN- $\lambda$ R1 bzw. IL28R und dem IL10R2 besteht. Die IL10R2-Untereinheit wird auch von IL-10, IL-22 und IL-26 zur Signaltransduktion genutzt. Die exakten Signalmoleküle und –wege, die nach Bindung von IFN- $\lambda$  an den entsprechenden Rezeptor induziert werden, sind bis heute nicht vollständig geklärt. Es werden jedoch Moleküle zur Signaltransduktion genutzt, die auch durch Typ I IFN induziert werden können (*Abbildung 2*).

### 2.1.3 IFN-induzierte Signalwege

Die Bindung von Interferonen an die entsprechenden Rezeptoren führt zur Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges sowie weiterer Signalwege. Alle Typ I IFN-Subtypen binden mit unterschiedlicher Affinität an den IFNAR, dessen Untereinheiten mit den Janus Protein

Tyrosin Kinasen TYK2 und JAK1 assoziiert sind. IFN- $\gamma$  bindet an den IFNGR, dessen IFNGR-1 Untereinheit konstitutiv mit JAK1 und die IFNGR-2 Untereinheit mit JAK2 assoziiert ist<sup>9,13,14</sup>. Die Bindung beider IFN-Typen an die entsprechenden Rezeptoren führt zur Kreuz-Aktivierung der JAK Kinasen, die daraufhin STAT1 und STAT2, Mitgliedern der „Signal Transducer and Activation of Transcription“ (STAT)-Familie, phosphorylieren. Typ I IFN führen über die Phosphorylierung von STAT-Molekülen zur Bildung des heterotrimeren Komplexes „IFN-stimulated Gene Factor 3“ (ISGF3), der aus phosphorylierten STAT1, STAT2 und IRF9 besteht<sup>15</sup>. Die Bindung von Typ II IFN an den entsprechenden Rezeptor führt zur Bildung des „IFN- $\gamma$  activated factor“ (GAF, auch „IFN- $\alpha$  activated factor“ AAF). GAF/AAF ist ein Homodimer aus phosphorylierten STAT1-Molekülen. Nach der Aktivierung von ISGF3 und GAF/AAF kommt es zur Kerntranslokation beider Komplexe und der Bindung an spezifische DNA-Sequenzen, den “IFN-stimulated regulatory elements“ (ISRE)<sup>16,17</sup> sowie der „IFN- $\gamma$  activated sequence“ (GAS)<sup>18,19</sup>. Dadurch wird eine Vielzahl von Zielgenen (IFN-stimulated genes, ISGs) induziert, die für die biologischen Aktivitäten von Interferonen notwendig sind (*Abbildung 2*).



**Abbildung 2 Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges und weiterer Signalkaskaden durch Interferone**

Interferone können in Typ I (IFN- $\alpha$  und  $\beta$ ), Typ II (IFN- $\gamma$ ) und Typ III (IFN- $\lambda$ ) IFN unterteilt werden und binden an die entsprechenden Rezeptoren. Typ I und Typ II IFN aktivieren den klassischen Jak/STAT-Signalweg. Typ I IFN führen hauptsächlich zur Bildung des ISGF3, der nach der Kerntranslokation an ISRE im Promoter verschiedener ISGs bindet. Typ II IFN führen v.a. zur Bildung des AAF/GAF-Komplexes, der an GAS-Elemente bestimmter ISGs bindet. Typ III IFN führen möglicherweise zur Aktivierung von STAT1 und STAT2 über bisher als Jak Kinasen bezeichnete Moleküle. Es wird vermutet, dass sie Gene ebenfalls über ISGF3 und AAF/GAF-komplexe induzieren. Durch Typ I IFN werden noch weitere Signalwege induziert. Eine IFN-Stimulation kann zur Phosphorylierung von STAT5 und CrkL über Tyk2 führen und die Bildung eines Heterodimers führen, der nach der Kerntranslokation GAS-Elemente bindet. Auch STAT4-Moleküle können durch Typ I IFN Stimulation aktiviert werden, wobei die Aktivierung von STAT4 von den IFN-Subtypen abhängig ist. Typ I IFN können auch, möglicherweise unabhängig von STAT-Molekülen, den PI3-Kinase Signalweg induzieren. Aktivierte PI3-Kinase kann die Aktivierung von Akt und PKC verstärken und die Aktivierung von NF $\kappa$ B beeinflussen. Zusätzlich wurde beschrieben, dass Typ I IFN die MAP-Kinasen ERK2 und p38 aktivieren können (Takaoka & Yanai 2006).

Neben der Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges durch Typ I IFN gibt es jedoch zunehmend Hinweise, dass auch andere Signalmoleküle und -kaskaden eine Rolle bei den IFN-vermittelten Effekten spielen. Hierzu gehören der „Mitogen activated Protein Kinase“ (MAPK)-, der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)- sowie der klassische als auch der

alternative „Nuclear Factor kappa B“ (NF $\kappa$ B)-Signalweg<sup>20</sup> (Abbildung 2). Diese Signalwege werden auch von klassischen Immun-Rezeptoren, wie z.B. dem T-Zell-Rezeptor (TZR), zur Signaltransduktion genutzt. Dies lässt vermuten, dass sich IFNAR-induzierte Signalwege und Immun-Rezeptor-vermittelte Signalkaskaden gegenseitig beeinflussen und ein so genannter „Crosstalk“ existiert.

## 2.2 CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Ziel der adaptiven Immunantwort ist es, Infektionen pathogenspezifisch zu bekämpfen. Zu den Zellen der adaptiven Immunantwort gehören B-Zellen sowie CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Während B-Zellen über die Bildung von Antikörpern die humorale Immunantwort darstellen, sind T-Zellen an der zellvermittelten Immunantwort beteiligt. Die Aufgabe von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bzw. „Cytotoxic T Lymphocytes“ (CTLs) ist es, infizierte Zellen oder Tumorzellen zu töten.

### 2.2.1 Die Aktivierung von T-Zellen

Naive T-Zellen werden nach Infektionen durch „Antigen-presenting cells“ (APCs), wie beispielsweise Dendritischen Zellen, aktiviert. DCs erkennen als so genannte „Wächter“ des Immunsystems infizierte Zellen. Zelluläre oder Pathogen-assoziierte Proteine werden von den DCs prozessiert und spezifische Peptide via „Major Histocompatibility Class“ (MHC)-Molekülen den Zellen der adaptiven Immunantwort präsentiert. Dies geschieht in den sogenannten T-Zellzonen der drainierenden Lymphknoten, in die gewebs-residente DCs entlang eines Chemokingradienten nach ihrer Aktivierung einwandern. CD8<sup>+</sup> T-Zellen

können Antigene nur im Kontext von MHC-I-Molekülen erkennen<sup>21</sup>. Nach dem 2-Signal-Modell benötigen T-Zellen für ihre vollständige Aktivierung eine Stimulation des TZR sowie die Bindung co-stimulatorischer Liganden<sup>22</sup>. Die Interaktion zwischen MHC-I-Peptid-Komplexen und dem TZR wird auch als Signal 1 bezeichnet. Die am besten charakterisierte Co-Stimulation ist die Interaktion zwischen CD28 auf T-Zellen und B7-1 bzw. B7-2 auf APCs, die das benötigte zweite Signal darstellen kann<sup>23-25</sup>. Allgemein sind Co-Stimulationen über Rezeptoren, wie CD28, LFA-1, ICOS, 41-BB und OX-40 notwendig, um die immunologische Synapse zwischen T-Zellen und APCs auszubilden und TZR-induzierte Signalwege zu verstärken<sup>26</sup>. Mittlerweise gibt es Hinweise, dass ein drittes Signal in Form von Zytokinen, wie IL-12 oder Typ I IFN, notwendig ist, um naive T-Zellen vollständig zu aktivieren<sup>27</sup>.

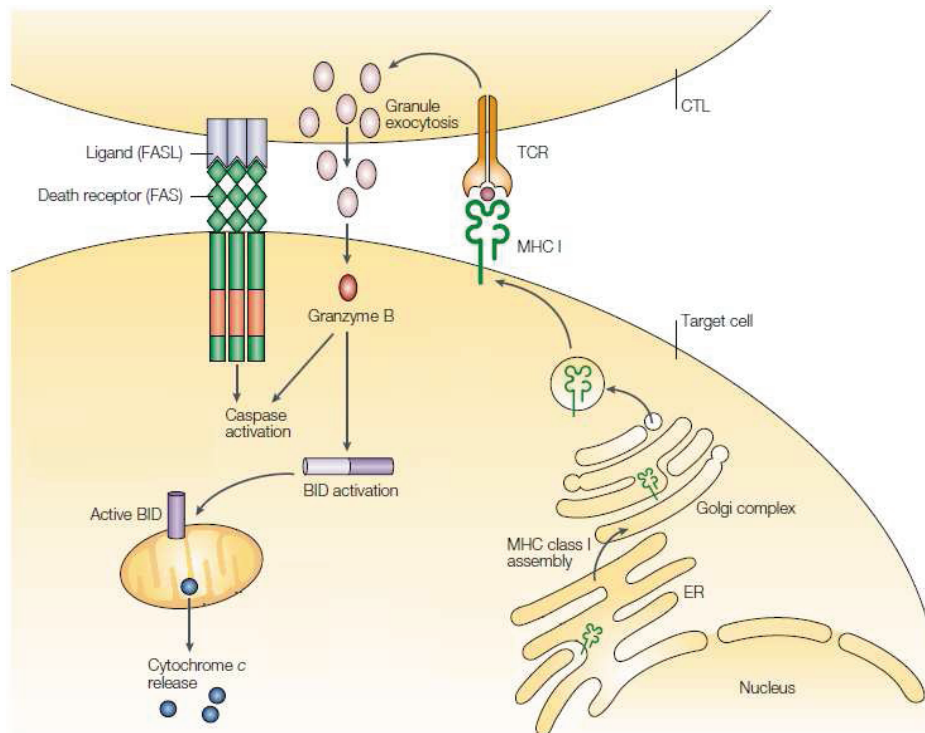
Die Aktivierung von T-Zellen ist durch die Expression von Aktivierungsmarkern gekennzeichnet. Als einer der ersten Oberflächenmarker, der nach der Aktivierung von T-Zellen von diesen exprimiert wird, wurde CD69 identifiziert, der bereits ein bis zwei Stunden nach der Aktivierung nachgewiesen werden kann<sup>28</sup>. Darüber hinaus zeigt die Expressionsstärke von CD62L den Aktivierungsgrad von T-Zellen an. Naive T-Zellen exprimieren CD62L, einen Homing-Rezeptor, der notwendig ist, um aus dem Blutstrom in Lymphknoten zu migrieren und dort von APCs aktiviert zu werden<sup>29</sup>. Nach der Aktivierung von T-Zellen wird die Expression von CD62L herunterreguliert und aktivierte T-Zellen besitzen einen CD62L<sup>low</sup>-Phänotyp<sup>30,31</sup>. Auch die Expression von CD25, der  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors, kennzeichnet die Aktivierung von T-Zellen. Die Fähigkeit auf IL-2 zu reagieren ist essentiell für das Überleben, Homeostase und Proliferation von T-Zellen<sup>32</sup>. IL-2 wird von aktivierten T-Zellen produziert und wirkt über die Bindung an den entsprechenden Rezeptor autokrin und parakrin auf T-Zellen. IL-2 fungiert als extrinsisches Überlebenssignal und

unterstützt die klonale Expansion und Differenzierung naiver  $CD8^+$  T-Zellen zu Effektorzellen<sup>33</sup>.

### 2.2.2 Expansion und Ausbildung von Effektorfunktionen

Nach ihrer Aktivierung durchlaufen  $CD8^+$  T-Zellen eine so genannte klonale Expansionsphase, in der die Zellen proliferieren und es zu einem starken Anstieg der Anzahl antigenspezifischer, aktivierter  $CD8^+$  T-Zellen kommt. Die aktivierten T-Zellen migrieren zum Infektionsort und differenzieren zu CTLs. Diese nutzen verschiedene Mechanismen, um Zielzellen zu töten. Nach dem Erkennen von Zielzellen werden Granula mit Zytotoxinen wie Granzym B und Perforin gezielt in den Extrazellulärraum zwischen den Zellen ausgeschüttet und in den Zielzellen Apoptose induziert. Ursprünglich wurde angenommen, dass Perforin durch Polymerisation eine Porenbildung in der Membran der Zielzelle auslöst, um Granzym B den Eintritt zu ermöglichen. Mittlerweile wurden jedoch Rezeptoren für Granzym B charakterisiert, die vermuten lassen, dass Granzyme über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zielzellen gelangen und Perforin benötigt wird, um sie aus den Endosomen freizusetzen. In der Zielzelle führt Granzym B dann über den Abbau von Caspasen zur Aktivierung von apoptotischen Signalwegen<sup>34</sup>. Eine weitere Methode Zielzellen zu töten, ist es über Todes-Rezeptoren wie Fas Apoptose zu induzieren. Zur Induktion von Apoptose in Zielzellen über Todes-Rezeptoren exprimieren  $CD8^+$  T-Zellen u.a. den Fas Liganden (FasL) und den „TNF-related apoptosis inducing ligand“ (TRAIL). Die Bindung dieser Liganden an die entsprechenden Rezeptoren induziert ebenfalls Caspase-abhängige Signalwege in den Zielzellen<sup>34</sup> (*Abbildung 3*). Zusätzlich werden Zytokine, wie  $IFN-\gamma$  und „Tumor necrosis factor- $\alpha$ “ (TNF- $\alpha$ ), produziert, um z.B. Makrophagen zu aktivieren<sup>35</sup>.





**Abbildung 3 Das Töten von Zielzellen über Granzym B und Fas-vermittelte Apoptose-Induktion**  
 $CD8^+$  T-Zellen erkennen Zielzellen über Antigene, die auf MHC-Klasse I Molekülen präsentiert werden. Nach der Aktivierung des TZR werden Granula, die Granzym B enthalten, gezielt in den Interzellularraum ausgeschüttet, oder die Expression des Fas Liganden induziert. Granzym B aktiviert daraufhin Caspasen oder BID, welches daraufhin zu Mitochondrien transloziert und zur Ausschüttung von Cytochrom C und somit ebenfalls zur Aktivierung von Caspasen führt. Fas-Liganden binden an den Fas-Rezeptor und induzieren somit ebenfalls die Aktivierung von Caspasen (Barry & Bleakley 2002).

### 2.2.3 Differenzierung zu T-Gedächtniszellen

Im Falle einer erfolgreichen Bekämpfung der Infektion, kommt es während der Kontraktionsphase zum induzierten Zelltod einer Vielzahl antigen-spezifischer T-Zellen. Die Zellen, die überleben, stellen T-Gedächtnis-Zellen dar. Diese T-Gedächtnis-Zellen können eine erneute Infektion schneller und effektiver bekämpfen. Mittlerweise gibt es weitere Hypothesen, wie naive T-Zellen zu Gedächtnis-Zellen differenzieren. So besagt eine Hypothese, dass naive T-Zellen direkt nach ihrer Aktivierung entweder zu Effektor- oder zu Gedächtnis-Zellen differenzieren, während ein anderes Modell besagt, dass T-Zellen abhängig von der Dauer einer Antigen-Stimulation zu zentralen T-Gedächtnis- („central memory“,



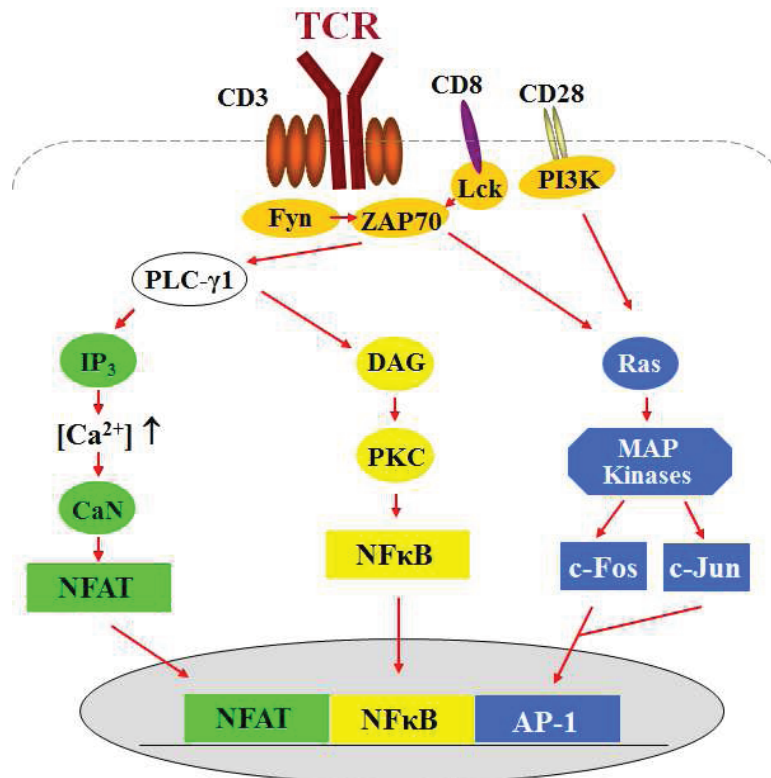
T<sub>CM</sub>) oder Effektor-T-Gedächtnis („effector memory“, T<sub>EM</sub>) -Zellen differenzieren<sup>35-37</sup>. CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> produzieren nur geringe Mengen von Effektor-Molekülen, wie IFN- $\gamma$ , und zytotoxische Moleküle, wie Granzym B und Perforin<sup>36-38</sup>, sind jedoch in der Lage IL-2 zu produzieren. Im Gegensatz dazu können T<sub>EM</sub> konstitutiv Effektormoleküle produzieren. Eine Vielzahl von Oberflächenmarkern charakterisiert zentrale und Effektor-T-Gedächtniszellen, wobei CD44 stabil von allen T-Gedächtnis-Zellen exprimiert wird.

## 2.2.4 Periphere Toleranzmechanismen

Immunantworten müssen genau reguliert werden, da andernfalls eine Schädigung des Organismus verursacht werden kann. Aus diesem Grund werden in bestimmten Fällen anstelle von Expansion und Effektorfunktion Toleranz-Mechanismen induziert. Toleranz-Mechanismen sind dabei entscheidend, um überschießende oder unnötige Immunreaktionen zu verhindern, können jedoch auch bei fehlender Co-Stimulation aufgrund von Virus-Infektionen oder bei Krebserkrankungen auftreten. Anergie ist ein Toleranz-Mechanismus, bei dem T-Zellen nach einer Antigenstimulation mit fehlender Co-Stimulation oder starker Co-Inhibition funktionell inaktiviert sind. Anergie Zellen überleben, können jedoch auf weitere Stimulationen nicht reagieren. Durch Anergie können Proliferation und/oder Effektorfunktion gehemmt sein<sup>39</sup>. Ein weiterer, unabhängiger Toleranzmechanismus, der z.B. nach chronischen Infektionen oder Krebserkrankungen auftritt, ist ein als „Exhaustion“ bezeichneter Phänotyp. Diese T-Zellen haben ein vermindertes Potential zur Proliferation sowie zur Sekretion von Zytokinen und sind durch die Expression inhibitorischer Rezeptoren, wie „Programmed Cell Death-1“ (PD-1), „Lymphocyte activation gene 3“ (Lag3), CD244 (2B4), „T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3“ (TIM3) und „Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4“ (CTLA-4) gekennzeichnet<sup>40</sup>.

### 2.2.5 Der T-Zell-Rezeptor-Signalweg

Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt über die Bindung des Peptid-MHC-Komplexes an den T-Zell-Rezeptor. Dieser besteht aus verschiedenen Untereinheiten. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten vermitteln die Bindung an den Liganden, während die CD3 $\epsilon$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ -Ketten sowie die TZR $\zeta$ -Kette die Induktion der Signalkaskaden vermitteln<sup>41-43</sup>. Das erste Ereignis nach der Bindung des TZR ist die Aktivierung der Src Kinasen Lck und Fyn. Der genaue Mechanismus, der zur Aktivierung dieser Kinasen führt, ist bisher nicht bekannt. Die Aktivierung führt jedoch zum Entfernen inhibitorischer C-terminaler Tyrosin-Phosphat-Reste durch die Phosphatase CD45. Daraus folgen Konformationsänderungen, die Interaktionen mit anderen Signalmolekülen ermöglichen. Die Kinasen phosphorylieren daraufhin „Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motives“ (ITAMs), die als Einzelkopie an den CD3 $\epsilon$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ -Ketten sowie als Triplikate an der TZR $\zeta$ -Kette zu finden sind. ITAMs besitzen eine Konsensus-Sequenz, in der bestimmte Tyrosine als Substrat für Src-Kinasen dienen. Die Phosphorylierung dieser ITAMs führt zur Rekrutierung der „ $\zeta$ -Chain-associated protein kinase of 70 kd“ (Zap70), welche durch Lck phosphoryliert und aktiviert wird. CD4 bzw. CD8 Co-Rezeptoren stabilisieren die Interaktionen zwischen dem TZR und den präsentierten Antigen-Peptiden. Zap70 phosphoryliert daraufhin weitere Signalmoleküle, wie LAT, SLP-76 und Vav<sup>44</sup>. Dies führt dann zur Aktivierung weiterer Signalwege, wie z.B. dem Anstieg intrazellulären Kalziums sowie die Aktivierung von Protein Kinase C (PKC), NF $\kappa$ B und Ras-MAP-Kinasen. Die induzierten Signalwege aktivieren Transkriptionsfaktoren, wie „Activator Protein-1“ (AP-1), „Nuclear Factor of Activated T cells“ (NFAT) und Rel-Proteine (*Abbildung 4*). Diese regulieren letztendlich die Expression von Genen, die Proliferation, Differenzierung, Anergie oder Apoptose beeinflussen<sup>44</sup>.



#### Abbildung 4 T-Zell-Rezeptor-induzierte Signalwege

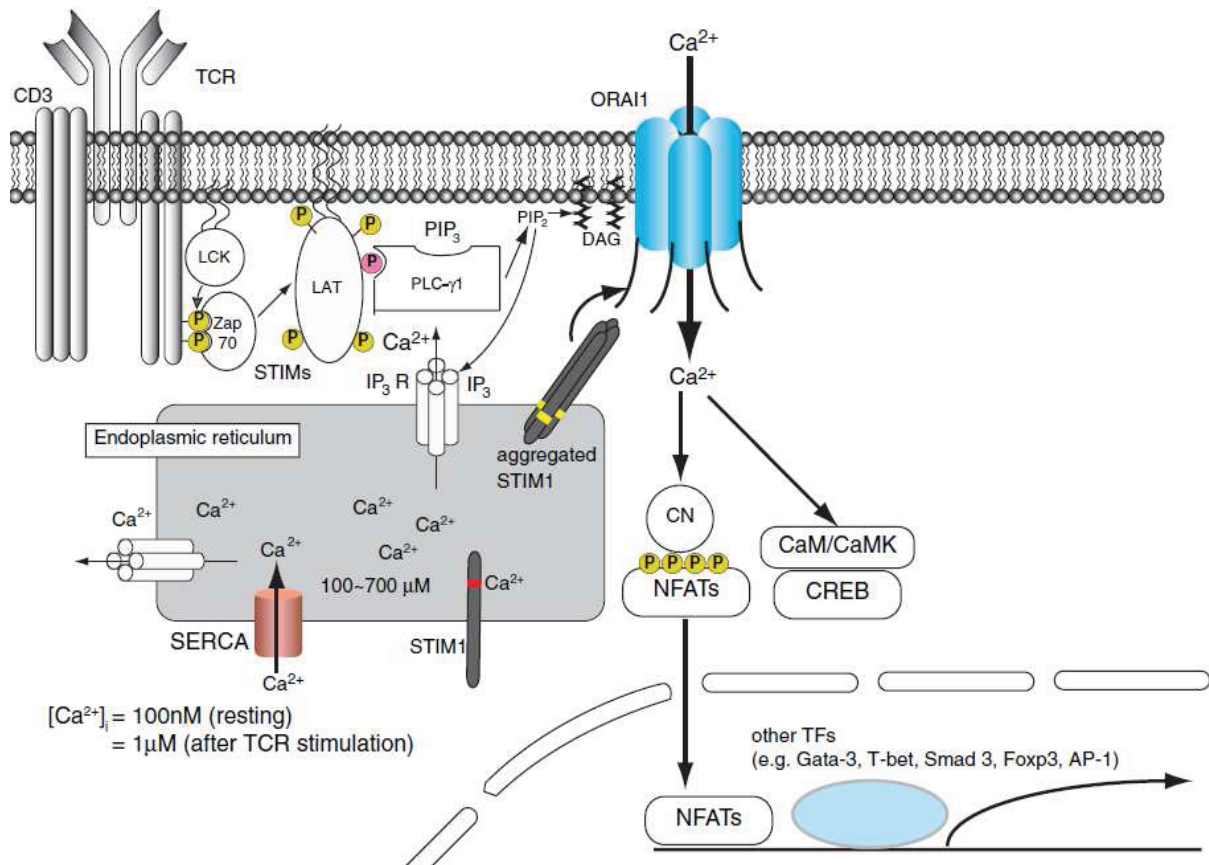
Die Bindung von Liganden an den TZR führt zur Aktivierung der Src-Kinasen Lck und Fyn, die zur Aktivierung von Zap70 führen. Daraufhin werden verschiedene Signalwege wie der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg, Signalwege zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und der Ras/MAPK-Signalweg induziert. Die verschiedenen Signalwege führen zur Kerntranslokation von Transkriptionsfaktoren, wie NFAT, AP-1 und NF $\kappa$ B. Die dadurch induzierten Gene vermitteln Proliferation, Zytokinproduktion und Effektorfunktionen.

##### 2.2.5.1 Der Kalzium-Signalweg

Der Kalzium-Signalweg ist entscheidend für Proliferation, Expression von Aktivierungsmarkern, Produktion von Zytokinen und Chemokinen, die Differenzierung von naiven zu Gedächtniszellen, aber auch für die Induktion von Anergie. Die Bindung von Antigenen an den TZR induziert über verschiedene Protein-Kinasen die Aktivierung der Phospholipase C- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1)<sup>45-47</sup> (Abbildung 4). Diese hydrolysiert daraufhin Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> bindet an IP<sub>3</sub>-Rezeptoren, die als Kalzium-permeable Ionen-Kanäle in

der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) vorliegen. Dadurch kommt es zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus diesem intrazellulären Kalzium-Speicher. Die Abnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im ER führt zur Aktivierung des „store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry“ (SOCE)-Signalweges, der zur Öffnung von so genannten „ $\text{Ca}^{2+}$ -release activated  $\text{Ca}^{2+}$ “ (CRAC)-Kanälen in der Plasmamembran führt. Verminderte Kalzium-Konzentrationen im ER werden durch die ER  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren STIM1 und STIM2 detektiert. Diese aggregieren daraufhin und binden an ORAI1. ORAI1 bildet als Tetramer den CRAC-Kanal und führt nach der Aktivierung durch STIM-Moleküle zum Influx extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx kann kurzfristig die Motilität von T-Zellen einschränken, dadurch die Interaktion mit APCs verlängern und in Effektorzellen zur Degranulation führen. Die durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt darüber hinaus zur Aktivierung verschiedener Signalwege wie den Calcineurin/NFAT-Weg. Die Aktivierung der Serin/Threonin Phosphatase Calcineurin erfolgt über die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin an die regulatorische Untereinheit und der Dislokation der autoinhibitorischen Domäne. Aktiviertes Calcineurin führt zur Dephosphorylierung von zytoplasmatischen NFAT-Proteinen, wodurch deren nukleäre Lokalisations-Sequenz (NLS) demaskiert wird und NFAT in den Zellkern transloziert<sup>48</sup> (*Abbildung 5*). Dies hat die Expression verschiedener Zielgene, wie beispielsweise IL-2, zur Folge.

Die Genexpression, die durch NFAT induziert wird, hängt stark von anhaltendem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx und der Aktivität von Calcineurin ab. Sobald die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abnimmt, wird NFAT durch NFAT-Kinasen rephosphoryliert und die NLS erneut maskiert. Dies führt zu einem raschen Export von NFAT aus dem Zellkern<sup>49</sup> und einer exakten Regulierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Geninduktion.



**Abbildung 5 Der TZR-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg**

Die Aktivierung des TZR führt über Protein Tyrosin Kinasen, wie Lck und Zap70, zur Phosphorylierung und Aktivierung von  $\text{PLC-}\gamma 1$ .  $\text{PLC-}\gamma 1$  hydrolysiert das Membran-gebundene Phospholipid  $\text{PIP}_2$  zu DAG und  $\text{IP}_3$ .  $\text{IP}_3$  öffnet daraufhin  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren im ER, wodurch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem ER freigesetzt werden. Die verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im ER wird durch STIM-Sensoren detektiert, die daraufhin aggregieren und CRAC-Kanäle bestehend aus ORAI-Tetrameren aktivieren. Der resultierende  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx erhöht die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und aktiviert u.a. den Calcineurin/NFAT-Signalweg und reguliert den CaMK-CREB-Signalweg. Zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren induziert NFAT bestimmte Zielgene. (Oh-Hora & Rao 2008)

Neben der Aktivierung von NFAT über Calcineurin, können  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale zur Proteolyse von I $\kappa$ B und somit zur Aktivierung von NF $\kappa$ B führen.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen können auch innerhalb des Nukleus auf verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie CREB und dem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Co-Aktivator „CREB-binding Protein“ (CBP)<sup>50,51</sup>, oder regulierend auf den Ras/MAPK-Signalweg wirken<sup>52</sup>. Alle  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Transkriptionsfaktoren aktivieren eine Vielzahl von Genen. Dazu gehören IL-2 oder Fas und Fas Liganden. Dadurch werden Proliferation bzw. DNA-Synthese oder Apoptose induziert.

### 2.2.5.2 Der Ras/MAPK-Signalweg

Die Stimulation des TZR führt zur Aktivierung verschiedener MAPK-Signalwege (*Abbildung 4*). MAP-Kinasen sind Serin/Threonin Kinasen, die in die drei Untergruppen „Extracellular signal-regulated Kinase“ (Erk), p38 und „c-Jun terminal Kinases“ (JNK) unterteilt werden können. Für die Aktivierung des MAPK-Signalweges ist die Rekrutierung von LAT und die Aktivierung von „Guanine nukleotide exchange factors“ (GEFs) notwendig. GEFs aktivieren GTP-bindende Proteine wie Ras, Rac-1 und Cdc42 durch die Umwandlung der GDP-gebundenen, inaktiven Form in die GTP-gebundene, aktive Form. Diese Proteine phosphorylieren und aktivieren MAP3-Kinasen, die wiederum MAP2-Kinasen phosphorylieren und aktivieren. Diese MAP2-Kinasen führen letztendlich zur Phosphorylierung und Aktivierung der MAPK ERK, p38 und JNK<sup>44</sup>. Aktivierung und Inaktivierung von Ras, welches zur Phosphorylierung von Erk führt, wird über die Aktivität von GEFs, die u.a. über DAG aktiviert werden, und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) reguliert<sup>44</sup>. Die Aktivierung von Erk ist wichtig für die Aktivierung der AP-1 Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-myc<sup>44</sup>.

Die Aktivierung der p38 MAPK- und JNK-Kaskade erfolgt über die Phosphorylierung des GEFs Vav durch Zap70, was zur Aktivierung von Rac-1 und Cdc42 führt. Eine Co-Stimulation von CD28 erhöht hierbei die Rekrutierung von Vav zu Lat und Zap-70 und verstärkt somit die Phosphorylierung von Vav durch Zap70. Rac-1 aktiviert die p38-MAPK-Kaskade, die indirekt über Protein Kinasen oder direkt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie CREB, „Activating transcription factor 1“ (ATF-1) und NFκB sowie STAT1 und STAT3 führt. Cdc42 führt zu Aktivierung von JNK, welches u.a. c-Jun phosphoryliert und damit die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 erhöht. Auch andere Transkriptionsfaktoren, wie NFAT oder anti-apoptotische Bcl-2 Mitglieder werden durch JNK aktiviert. Sowohl die p38-MAPK- als auch die JNK-Kaskade spielen eine wichtige Rolle

bei der Expression von Zytokinen, wie IFN- $\gamma$  und IL-2 sowie bei Apoptose-regulierenden Prozessen<sup>44</sup>.

### **2.2.5.3 Die Aktivierung von NF $\kappa$ B**

Die genauen Mechanismen, die den NF $\kappa$ B-Signalweg nach TZR-Aktivierung initiieren sind nicht bekannt, scheinen aber die Rekrutierung der PKC- $\theta$  zur TZR Synapse zu involvieren<sup>53</sup>. Das Signalmolekül Vav sowie Bestandteile des Zytoskeletts scheinen für die Rekrutierung von PKC- $\theta$  notwendig zu sein. PKC- $\theta$  wird durch DAG stimuliert, welches nach der Aktivierung von PLC- $\gamma$ 1, aber auch durch PI3K produziert wird. PKC- $\theta$  wird daraufhin durch PDK1 phosphoryliert, wodurch die Bildung des so genannten CBM-Komplexes, bestehend aus CARMA1, Bcl10 und MALT1, induziert wird. Über Ubiquitinierung kommt es zur Aktivierung des NEMO/I $\kappa$ B-Komplexes. Die I $\kappa$ B Kinasen I $\kappa$ B- $\alpha$  und I $\kappa$ B- $\beta$  bilden hierbei über die nicht-katalytische Untereinheit I $\kappa$ B- $\gamma$  Heterodimere<sup>54,55</sup>. Der aktivierte I $\kappa$ B-Komplex induziert die Phosphorylierung und proteolytische Degradation der inhibitorischen I $\kappa$ B- $\alpha$  und I $\kappa$ B- $\beta$ -Proteine. Dies führt zur Freisetzung der NF $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren p65, c-Rel, RelA und p50, da diese ohne Stimulation im Zytosol an I $\kappa$ B-Proteinen gebunden vorliegen. Nach der Translokation in den Zellkern werden Gene induziert, die eine Rolle für die Proliferation und das Überleben von T-Zellen spielen<sup>44,54,55</sup>.



### 2.3 Effekte von Typ I IFN auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Typ I IFN wird in großen Mengen nach Infektionen produziert und zeigt vielfältige immunmodulatorische Effekte über direkte und indirekte Effekte auf verschiedene Immunzellen. So konnte gezeigt werden, dass Typ I IFN die Reifung von DCs sowie deren Expression von MHC-Molekülen und co-stimulatorischen Molekülen stimuliert und somit die Expansion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen verstärkt<sup>56-60</sup>. Zusätzlich kann Typ I IFN die Produktion von IL-15, das für die Homeostase von T-Gedächtniszellen notwendig ist, stimulieren<sup>61</sup>. Aber auch direkte Effekte von Typ I IFN auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind bekannt, wobei diese widersprüchlich sind. Typ I IFN kann als drittes potentiell Signal nach TZR- und Co-Rezeptor-Stimulation die Expansion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen verstärken<sup>27</sup> und Gene regulieren, die entscheidend für CTL-Effektorfunktionen sind<sup>62</sup>. Speziell nach LCMV-Infektionen ist Typ I IFN für die klonale Expansion sowie Differenzierung zu T-Gedächtnis-Zellen entscheidend<sup>56,63-65</sup>. Außerdem kann Typ I IFN unter bestimmten Bedingungen die Expression von IFN- $\gamma$  in T-Zellen unterstützen<sup>27</sup>.

Im Gegensatz dazu sind negative IFN-Effekte auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* und *in vivo* bekannt. Antiproliferative IFN-Effekte wurden *in vitro* vielfach beschrieben<sup>66-68</sup>, wobei diese *in vivo* über die Menge an STAT1 in Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen reguliert werden<sup>69</sup>. Nach intramuskulären Vakzinierungen wurden in IFNAR-defizienten Mäusen verbesserte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen identifiziert<sup>70</sup>. Typ I IFN kann außerdem unmittelbar nach Infektionen zur Lymphopenie über die Induktion von Apoptose in T-Zellen führen<sup>71-73</sup> und die IFN- $\gamma$ -Expression abhängig vom IFNAR und STAT1 sowohl in NK- als auch in T-Zellen inhibieren<sup>74</sup>.

Eine IFN-Stimulation kann zur Rekrutierung von Lck, Zap70 und CD45 zum IFNAR führen, wodurch wichtige Signalmoleküle nicht für den TZR-Signalweg zur Verfügung stehen<sup>75</sup>. Die Typ I IFN-induzierte und dsRNA-aktivierte Kinase PKR kann die Proliferation von T-Zellen



entweder direkt über eine Inhibition der Proteinsynthese oder indirekt über die Produktion von IL-4 negativ regulieren<sup>76</sup>. Zusätzlich kann Typ I IFN den PI3K-Signalweg und daher über die Aktivierung von PKC- $\theta$  sowohl die Aktivierung von NF $\kappa$ B als auch JNK und p38 induzieren<sup>77</sup>. Dies und die beschriebenen Effekte von Typ I IFN auf T-Zellen lassen vermuten, dass sich IFN- und TZR-induzierte Signalwege gegenseitig beeinflussen können.

## 2.4 Zielsetzung

Typ I IFN wird nach viralen oder bakteriellen Infektionen als eine der ersten Abwehrreaktionen des Körpers produziert und zeigt antivirale Wirkungen. Über den Einfluss auf Zellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort ist Typ I IFN entscheidend an der Ausbildung und Modulierung von Immunreaktionen beteiligt. Die genauen Wirkungen von Typ I IFN auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind widersprüchlich. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sich IFN- und TZR-induzierte Signalkaskaden gegenseitig beeinflussen können und ein „Crosstalk“ existiert. Der molekulare Mechanismus dieser potentiellen Wechselwirkungen sowie die exakten kurz- und langfristigen Folgen für T-Zellen, sind bisher nicht bekannt.

Ziel dieser Arbeit ist die Effekte von Typ I IFN auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen über die Charakterisierung des potentiellen „Crosstalks“ zwischen IFN- und TZR-induzierten Signalwegen zu verifizieren und die Konsequenz für die Aktivierung und Funktion der T-Zellen zu überprüfen.

Im Versuchsansatz wird hierfür der Einfluss des Typ I IFN IFN- $\beta$  auf antigenspezifisch-stimulierte TZR-transgene CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* untersucht. Daraus ergeben sich die folgenden experimentellen Vorgehensweisen:

Zunächst soll überprüft werden, welchen Effekt Typ I IFN auf Proliferation, Effektorfunktion und Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen hat. Dazu sollen durchflusszytometrische Profile von T-Zellen mit und ohne Typ I IFN-Stimulation erstellt werden. Ob und wie sich IFN- und TZR-induzierte Signalwege beeinflussen, soll über die Untersuchung TZR-induzierter Signalwege mittels Western Blot-Analyse überprüft werden. Zusätzlich soll der Einfluss potentieller Wechselwirkungen auf die Induktion IFN- und TZR-stimulierter Gene analysiert werden. Schließlich wird der Einfluss einer IFN-Stimulation auf die Aktivierung von T-Zellen *in vivo* überprüft.

### 3. Ergebnisse

Interferone sind Zytokine, die als erste Abwehrreaktion des Körpers auf virale oder bakterielle Infektionen, aber auch in Folge von Entzündungen, produziert werden. Typ I IFN kann direkt auf infizierte Zellen wirken und beispielsweise die virale Replikation hemmen. Zusätzlich wirkt es direkt und indirekt auf Immunzellen und ist entscheidend an der Ausbildung von Abwehrmechanismen beteiligt<sup>56,78-82</sup>. Die beschriebenen direkten Effekte von Typ I IFN auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind widersprüchlich, lassen jedoch auf mögliche Interaktionen zwischen IFN-induzierten Signalwegen und den Signalkaskaden, die durch eine T-Zell-Rezeptor-Stimulation aktiviert werden, schließen. Ob und wie sich die induzierten Signalkaskaden beeinflussen und welche kurz- und langfristigen Folgen dies auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen hat, ist nicht bekannt. Aus diesem Grund sollte der direkte Einfluss von Typ I IFN auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen untersucht werden.

#### 3.1 Einfluss von Typ I IFN auf die TZR-Stimulation naiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Naive T-Zellen benötigen zur Aktivierung eine Stimulation des TZR sowie co-stimulatorischer Rezeptoren. Physiologische Liganden für den TZR sind Antigen-Peptide, die mittels MHC Klasse I-Molekülen auf der Oberfläche von APCs präsentiert werden. Zusätzlich findet eine Bindung zwischen Liganden der T-Zellen und Co-Rezeptoren der APCs statt. Diese koordinierte Wechselwirkung induziert die Proliferation von T-Zellen sowie die Differenzierung zu Effektorzellen. *In vitro* können T-Zellen auf unterschiedliche Weisen stimuliert werden. Eine unspezifische Aktivierung von T-Zellen kann mittels Antikörper erfolgen, die die TZR-assoziierte CD3ε-Kette binden. Die Stimulation mit löslichen CD3ε-Antikörpern führt in Anwesenheit einer Co-Stimulation mit APCs oder

CD28-Antikörpern zur Proliferation von T-Zellen<sup>83</sup> und induziert ohne eine Co-Stimulation Apoptose<sup>84</sup>. Die Stimulation mit immobilisierten CD3ε-Antikörpern führt konzentrationsabhängig auch ohne eine Co-Stimulation zur Proliferation von T-Zellen<sup>85,86</sup>. Neben einer solchen unspezifischen TZR-Stimulation ist auch eine antigen-spezifische Stimulation von T-Zellen möglich. Dazu muss jedoch das entsprechende Antigen bekannt sein. In dieser Arbeit wurden OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen verwendet, die einen transgenen TZR besitzen, der spezifisch für das SIINFEKL-Peptid (Ova 257-264) im Kontext von H-2k<sup>b</sup> ist. Zur antigen-spezifischen Stimulation dieses T-Zell-Rezeptors wurden die Zellen mit SIINFEKL-Streptameren, die aus vernetzten MHC-I-Molekülen und gebundenem SIINFEKL-Peptid bestehen, aktiviert. Diese Stimulation führt zu einer physiologischen Aktivierung von T-Zellen, benötigt jedoch keine Stimulation von Co-Rezeptoren. Eine Stimulation mit professionellen APCs, wie beispielsweise DCs, führt zur Stimulation des TZR und der Co-Rezeptoren, jedoch können bei einer solchen Methode zusätzliche Effekte durch beispielsweise produzierte Zytokine nicht ausgeschlossen werden.

Typ I IFN wird in sehr geringen Mengen konstitutiv exprimiert. Nach viralen Infektionen kommt es zu einer massiven Produktion von Typ I IFN. Dies wirkt sowohl lokal auf die produzierenden und benachbarten Zellen als auch systemisch über die Sekretion in den Blutstrom auf von der Infektionsstelle entfernte Zellen. Typ I IFN wird unmittelbar als Folge von Infektionen produziert. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass Typ I IFN auf T-Zellen wirkt, bevor diesen das entsprechende Antigen durch APCs präsentiert wird. Um eine ausreichende IFN-Stimulation der T-Zellen zu gewährleisten und den Effekt einer IFN-Vorstimulation zu simulieren, wurden OT-I T-Zellen für eine Stunde mit 500U/mL IFN-β behandelt und ohne weitere IFN-Behandlung zur Aktivierung des TZR mit den SIINFEKL-Streptameren inkubiert. Mit Hilfe dieses Versuchsansatzes sollte der Einfluss von Typ I IFN auf die Aktivierung, Proliferation und Ausbildung von Effektorfunktionen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen analysiert werden. Durch die Analyse einzelner TZR-vermittelter Signalwege und mögliche

Unterschiede in der Geninduktion sollten zudem potentielle Interaktionen zwischen IFNAR- und TZR-induzierten Signalwegen untersucht werden.

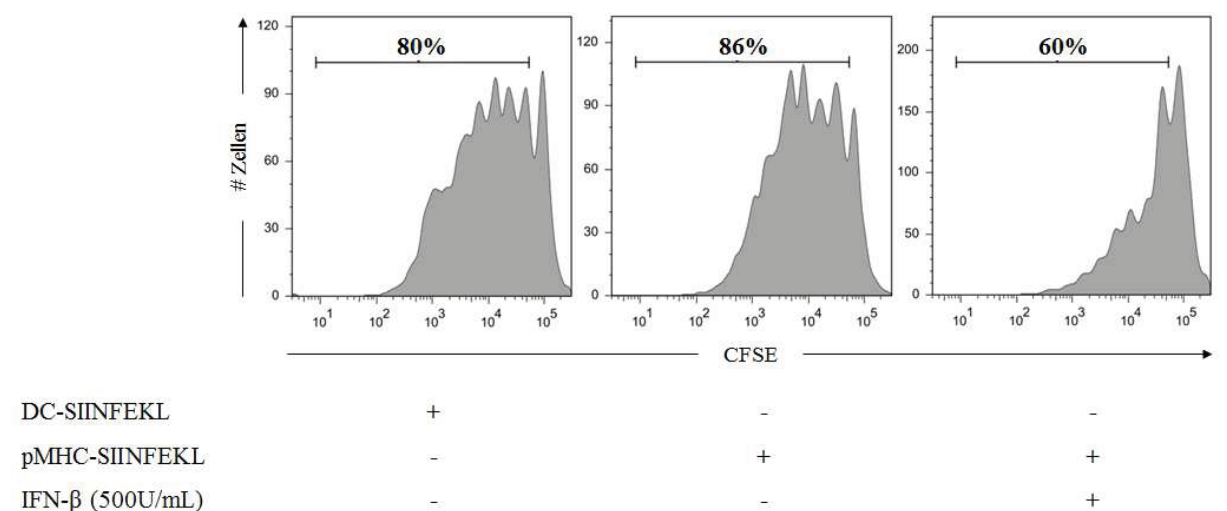
### 3.2 Der Einfluss von Typ I IFN auf die TZR-induzierte Proliferation von naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Nach ihrer Aktivierung durch DCs durchlaufen naive T-Zellen eine so genannte klonale Expansionsphase, in der es zu einer starken Vermehrung antigen-spezifischer T-Zellen kommt. Es ist bekannt, dass eine zusätzliche Stimulation mit Typ I IFN zu einer verbesserten Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt, wenn bei diesen mit Hilfe von artifiziellen APCs der TZR und Co-Rezeptoren stimuliert wurden<sup>27</sup>. Des Weiteren wurde gezeigt, dass direkte IFN-Signale entscheidend sind, da IFNAR-defiziente CD8<sup>+</sup> T-Zellen speziell nach LCMV-Infektionen die Expansionsphase nicht durchlaufen<sup>63</sup>. Typ I IFN zeigt jedoch vor allem bei einer T-Zell-Stimulation *in vitro* antiproliferative Effekte<sup>57,66,69,75</sup>. Antigen-spezifische T-Zellen können dabei *in vivo* diese antiproliferativen Effekte über das IFN-induzierte Signalmolekül STAT1 modulieren<sup>69</sup>. Aus diesem Grund sollte der direkte Einfluss von Typ I IFN auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht werden.

#### 3.2.1 Typ I IFN inhibiert die Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Um den Einfluss von Typ I IFN auf die Proliferation von naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen, wurden aufgereinigte, naive OT-I T-Zellen mit CFSE gefärbt, für eine Stunde mit 500U/mL IFN-β behandelt und anschließend der TZR mit SIINFEKL-Streptameren stimuliert. CFSE ist ein Farbstoff, der passiv in Zellen diffundiert, in diesen verbleibt und nach der Zellteilung zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben wird. Drei Tage nach der TZR-Stimulation wurde die Proliferation anhand der CFSE-Färbung mittels

Durchflusszytometrie überprüft. Um die Stimulation mit SIINFEKL-Streptameren mit der Stimulation über APCs zu vergleichen, wurden DCs anhand des charakteristischen Oberflächen-Markers CD11c isoliert, mit dem SIINFEKL-Peptid beladen und mit CFSE-gefärbten OT-I T-Zellen inkubiert. Die Stimulation von OT-I T-Zellen mit SIINFEKL-Peptid-beladenen CD11c<sup>+</sup> DCs führte zu einer starken Proliferation der T-Zellen. Die Proliferation von OT-I T-Zellen, bei denen der TZR mit SIINFEKL-Streptameren stimuliert wurde, war mit der durch APCs induzierten Proliferation vergleichbar. Zellen, die eine Stunde vor der SIINFEKL-Streptamer-Stimulation mit IFN behandelt wurden, zeigten hingegen eine deutlich verminderte Proliferation. Nur 60% dieser Zellen hatten sich geteilt, wobei die Zellen, die proliferierten, weniger Teilungen durchlaufen hatten. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine einstündige Vorstimulation mit Typ I IFN die Proliferation von naiven OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen inhibiert (Abbildung 6).

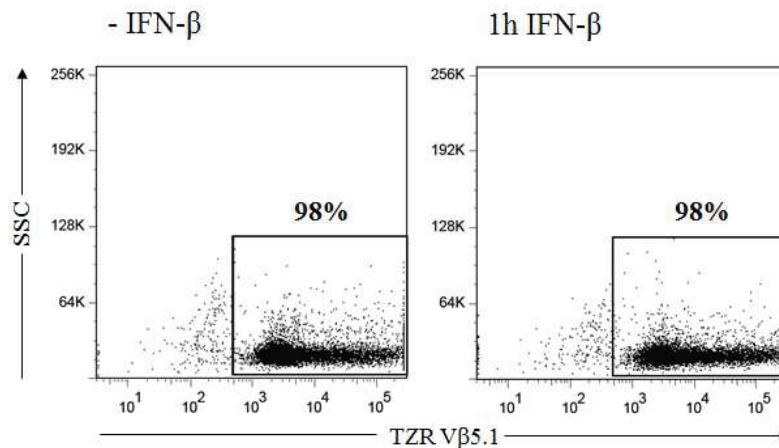


**Abbildung 6 Typ I Interferone inhibieren die Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

2 x 10<sup>6</sup> aufgereinigte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit CFSE gefärbt und für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Zellen mit SIINFEKL-Peptid beladenen CD11c<sup>+</sup> DCs oder SIINFEKL-Streptameren für 72 Stunden stimuliert. Die Proliferation wurde anhand des CFSE-Gehalts der Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Um zu überprüfen, ob die IFN-vermittelte Inhibition der Proliferation nicht auf eine mögliche, IFN-induzierte Internalisierung des TZR zurückzuführen ist, wurde die Expression des transgenen TZR von unbehandelten sowie für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimulierten

OT-I T-Zellen überprüft (*Abbildung 7*). Es konnten keine Unterschiede in der Expression des TZR zwischen unbehandelten und IFN-behandelten T-Zellen festgestellt werden. Die Typ I IFN-vermittelte Inhibition der TZR-induzierten Proliferation ist daher nicht auf eine Internalisierung des TZR und somit eine verminderte Stimulierbarkeit zurückzuführen.

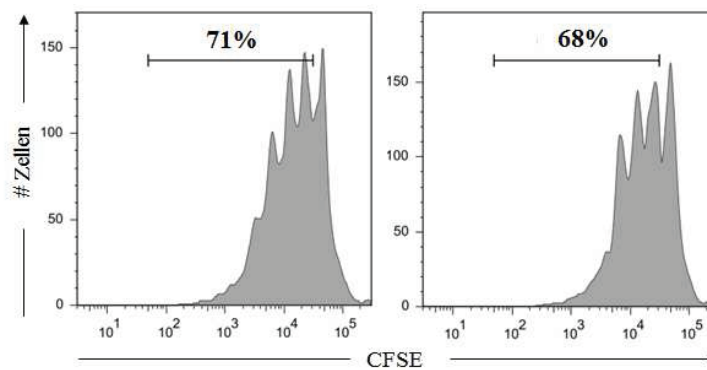


**Abbildung 7 Typ I IFN-Stimulation führt nicht zur Internalisierung des TZR**

$2 \times 10^6$  aufgereinigte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden unbehandelt belassen (- IFN-β) oder für eine Stunde mit 500U/mL IFN-β stimuliert (1h IFN-β). Die Expression des transgenen TZR Vβ 5.1 wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

### 3.2.2 Geringe Mengen IFN-β haben keinen Einfluss auf die Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Die Menge des produzierten IFNs nach Infektionen ist abhängig vom Pathogen<sup>65</sup>. Auch bakterielle Infektionen können zur Induktion von Typ I IFN führen, die produzierte Menge ist dabei in der Regel geringer als nach viralen Infektionen. Es sollte untersucht werden, welche Konzentration an IFN-β die Proliferation von T-Zellen nach TZR-Stimulation hemmen. CFSE-gefärbte, naive OT-I T-Zellen wurden für eine Stunde mit 50U/mL IFN-β stimuliert oder unbehandelt belassen und anschließend mit SIINFEKL-Streptameren für 72 Stunden inkubiert. Zellen, die mit IFN vorstimuliert wurden, wiesen eine zur alleinigen TZR-Stimulation vergleichbare Proliferation auf (*Abbildung 8*). Geringe Mengen IFN-β haben somit keinen Effekt auf die Proliferation von T-Zellen.



pMHC-SIINFEKL	+	+
IFN- $\beta$ (50U/mL)	-	+

**Abbildung 8 Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird durch geringe Mengen IFN-  $\beta$  nicht beeinflusst**

$2 \times 10^6$  aufgereinigte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit CFSE gefärbt und für eine Stunde mit 50U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Zellen mit SIINFEKL-Streptameren für 72 Stunden stimuliert. Die Proliferation wurde anhand des CFSE-Gehalts der Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente.

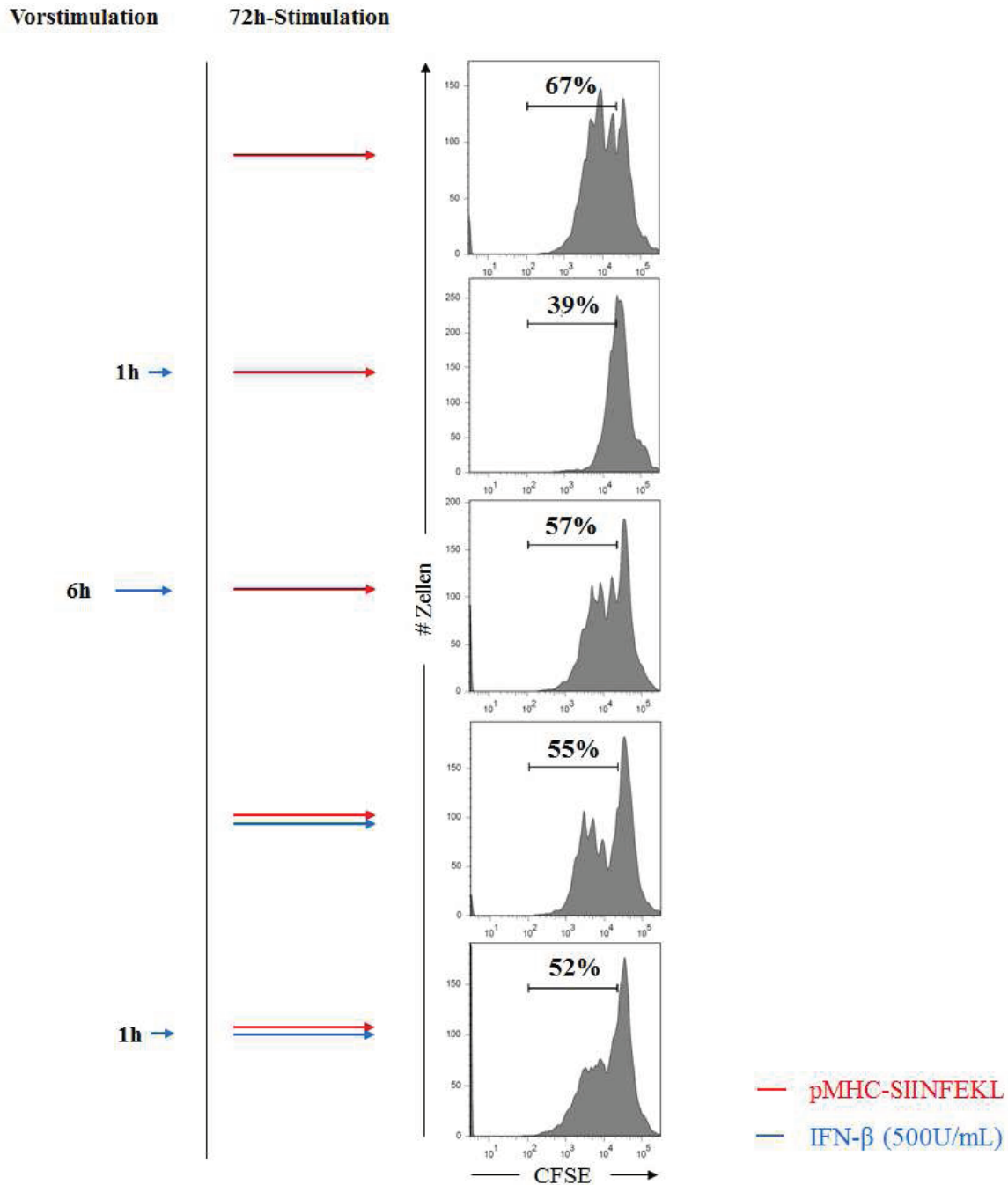
### 3.2.3 Einfluss von Zeitpunkt und Dauer einer IFN-Stimulation auf die Proliferation von T-Zellen

Die Konzentration von Typ I IFN spielt eine Rolle bei der IFN-vermittelten Inhibition der Proliferation von naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wenn diese eine Stunde vor der TZR-Stimulation mit IFN behandelt werden. Eine optimale Immunantwort ist abhängig vom zeitlichen Ablauf der Stimulation von T-Zellen. APCs müssen vor dem Kontakt mit naiven T-Zellen zunächst Antigene prozessieren und präsentieren, sowie co-stimulatorische Moleküle exprimieren, um eine vollständige Aktivierung von T-Zellen sicherzustellen. Es sollte deshalb untersucht werden, welchen Einfluss die Dauer und der Zeitpunkt einer IFN-Stimulation auf die Proliferation von T-Zellen hat. Um unterschiedlich lange IFN-Stimulationen vor einer Antigenstimulation zu simulieren, wurden aufgereinigte, naive OT-I T-Zellen mit CFSE gefärbt und für eine oder sechs Stunden mit 500U/mL IFN- $\beta$  (*blaue Pfeile, Abbildung 9*) stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurde das IFN gewaschen und die Zellen mit SIINFEKL-Streptameren (*rote Pfeile, Abbildung 9*) für 72 Stunden stimuliert.



Außerdem wurden T-Zellen zeitgleich mit IFN- $\beta$  und den SIINFEKL-Streptameren für 72 Stunden stimuliert oder für eine Stunde mit IFN- $\beta$  behandelt und anschließend in Anwesenheit von IFN mit SIINFEKL-Streptameren für 72 Stunden stimuliert.

T-Zellen, die nur mit SIINFEKL-Streptameren stimuliert wurden, zeigten eine starke Proliferation mit einem Anteil von 67% proliferierenden Zellen. Die einstündige Stimulation mit IFN- $\beta$  vor der TZR-Aktivierung zeigte die bereits beschriebenen antiproliferativen Effekte. Nur ca. 40% der Zellen proliferierten. Interessanterweise zeigten T-Zellen, die für sechs Stunden mit Typ I IFN vor der TZR-Stimulation inkubiert wurden, eine im Vergleich zur einstündigen Vorstimulation bessere Proliferation. Eine Co-Stimulation von TZR und IFNAR führte ebenfalls zu einer verminderten Proliferation im Vergleich zur alleinigen TZR-Stimulation. Diese war jedoch im Vergleich zur einstündigen IFN-Vorstimulation stärker. OT-I T-Zellen, bei denen nach der einstündigen Stimulation mit IFN- $\beta$ , das IFN nicht gewaschen wurde, zeigten nur eine leicht verminderte Proliferation vergleichbar mit co-stimulierten Zellen (*Abbildung 9*).



**Abbildung 9 Einfluss von Zeitpunkt und Dauer einer IFN-β-Stimulation auf die Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

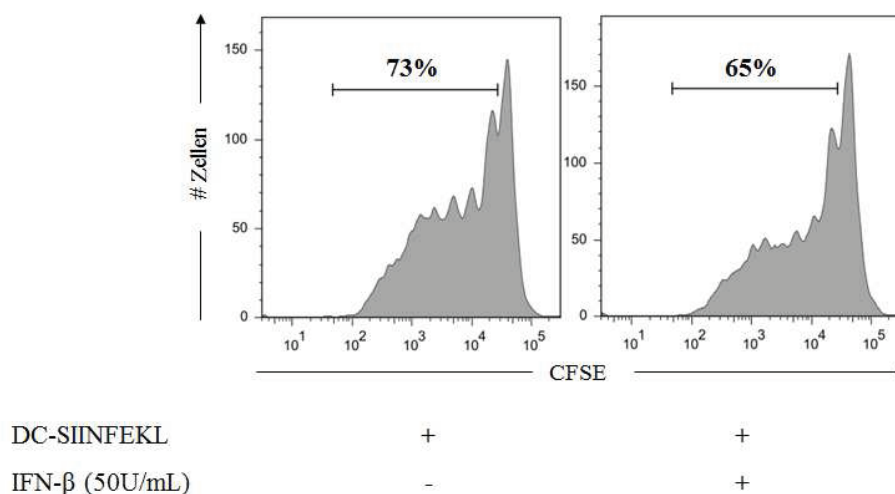
2 x 10<sup>6</sup> aufgereinigte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit CFSE gefärbt und für eine bzw. sechs Stunden mit 500U/mL IFN-β (*blaue Pfeile*) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach dem Wegwaschen von IFN erfolgte die TZR-Stimulation mit SIINFEKL Streptameren (*pMHC-SIINFEKL*, *rote Pfeile*). Zusätzlich Co-Stimulation von IFNAR und TZR für 72 Stunden oder einstündige IFN-Stimulation mit anschließender TZR-Stimulation für 72 Stunden ohne Wegwaschen von IFN. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Diese Daten zeigen, dass neben der Konzentration, der Zeitpunkt und die Dauer einer IFN-Stimulation entscheidend für die Effekte auf die Proliferation von T-Zellen sind.

### 3.2.4 Typ I IFN zeigt keine negativen Effekte nach TZR- und Co-Rezeptor-Stimulation

T-Zellen werden nach Infektionen durch APCs stimuliert. Für eine optimale Aktivierung benötigen T-Zellen Signale über den TZR sowie co-stimulatorische Rezeptoren, wie z.B. CD28. Es sollte untersucht werden, welchen Effekt eine IFN-Stimulation auf die Proliferation von T-Zellen hat, nachdem diese mit DCs, die sowohl den TZR binden als auch Liganden für Co-Rezeptoren exprimieren, aktiviert wurden.

Typ I IFN kann die Präsentation von Antigenen durch DCs verbessern<sup>59</sup>. Um ausschließlich IFN-vermittelte Effekte auf T-Zellen zu untersuchen, wurden CD11c<sup>+</sup> DCs aus IFNAR-defizienten Mäusen isoliert und mit dem SIINFEKL-Peptid beladen. Aufgereinigte, CFSE-gefärbte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden für eine Stunde mit 500U/mL IFN-β stimuliert oder unbehandelt belassen und anschließend für 72 Stunden mit den DCs kultiviert.



**Abbildung 10 IFN-β hat keinen Effekt auf die Proliferation von T-Zellen nach Stimulation mit dendritischen Zellen**

2 x 10<sup>6</sup> aufgereinigte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit CFSE gefärbt und für eine Stunde mit 500U/mL IFNβ behandelt oder unbehandelt gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit SIINFEKL gepulsten CD11c<sup>+</sup> DCs aus IFNAR<sup>-/-</sup>-Mäusen für 72 Stunden stimuliert und die Proliferation der Zellen anhand des CFSE-Gehalts mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Daten sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente.

Naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die mit SIINFEKL-Peptid-beladenen DCs inkubiert wurden, zeigten nach drei Tagen eine starke Proliferation. Eine IFN-Vorstimulation führte im Vergleich zu einer leicht verminderten Proliferation, die jedoch nicht als signifikant angesehen wird

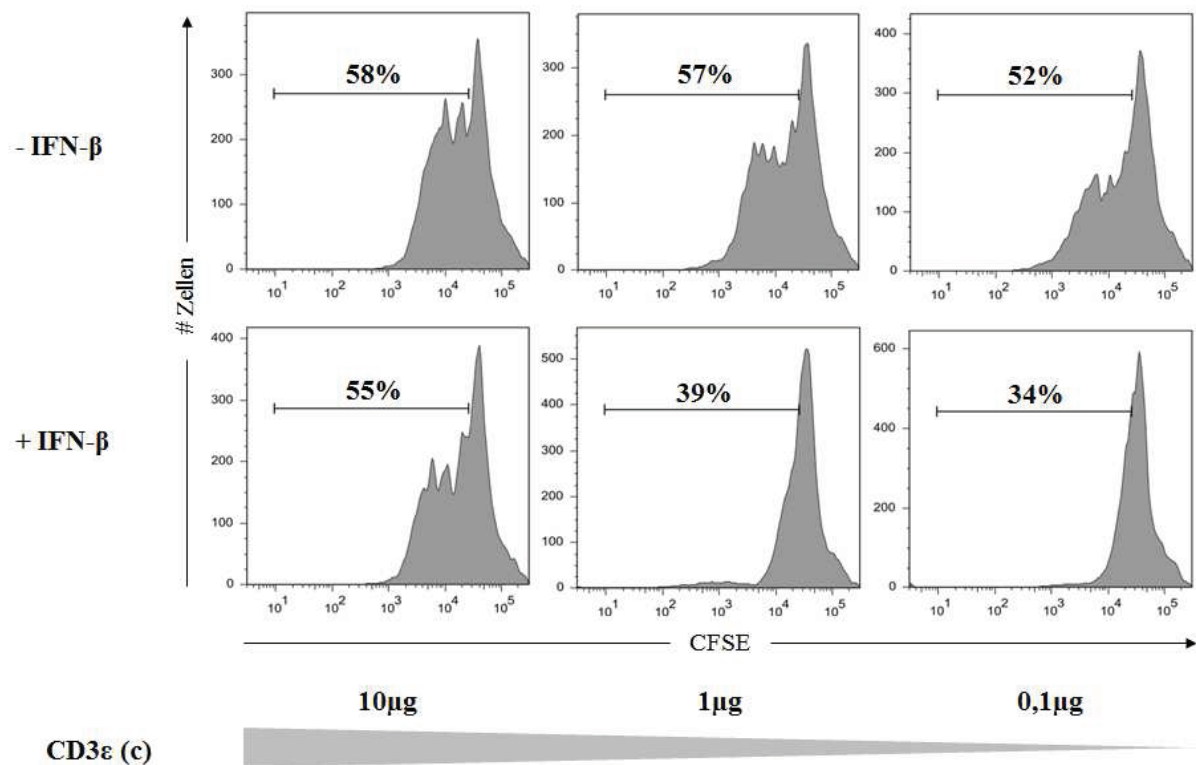
(Abbildung 10). Während Typ I IFN die Proliferation von naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die durch eine alleinige TZR-Stimulation aktiviert wurden, inhibieren kann, wird die Proliferation nach einer TZR-Stimulation mit der zusätzlichen Aktivierung co-stimulatorischer Rezeptoren nicht beeinflusst. Möglicherweise treten die beobachteten IFN-Effekte daher nur im Falle einer fehlenden oder suboptimalen Co-Stimulation auf.

### **3.2.5 Typ I IFN inhibiert die Proliferation von T-Zellen nach suboptimaler TZR-Stimulation**

Die durch DCs induzierte T-Zell-Proliferation wird durch Typ I IFN nicht beeinflusst, während die Proliferation nach einer alleinigen TZR-Stimulation durch IFN inhibiert werden kann. Es sollte untersucht werden, ob die Stärke einer TZR-Stimulation die Wirkung von Typ I IFN auf T-Zellen beeinflusst. Um unterschiedlich starke Stimulationen des TZR zu simulieren, wurden CFSE-gefärbte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen unbehandelt oder nach einstündiger IFN- $\beta$ -Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen immobilisierter CD3 $\epsilon$ -Antikörper stimuliert und die Proliferation nach 72 Stunden untersucht.

Die Stimulation von OT-I T-Zellen mit der optimalen Konzentration von 10 $\mu$ g immobilisierten CD3 $\epsilon$ -Antikörper induzierte eine starke Proliferation. Auch geringere Konzentrationen von 1 $\mu$ g und 0,1 $\mu$ g führten zur Proliferation der OT-I T-Zellen. T-Zellen, die mit 0,1 $\mu$ g immobilisierten CD3 $\epsilon$ -Antikörper stimuliert wurden, zeigten jedoch eine im Vergleich zu den höheren Konzentrationen verminderte Proliferation (Abbildung 11, obere Reihe). Eine IFN-Vorstimulation hatte keinen Einfluss auf die Proliferation der T-Zellen nach TZR-Stimulation mit einer optimalen Konzentration von 10 $\mu$ g CD3 $\epsilon$ -Antikörper. Die IFN-Vorbehandlung führte jedoch bei der Stimulation mit geringeren Mengen von 1 $\mu$ g bzw. 0,1 $\mu$ g CD3 $\epsilon$ -Antikörper zu einer verringerten Proliferation (Abbildung 11, untere Reihe). Diese Daten zeigen, dass Typ I IFN nicht in der Lage ist die Proliferation nach optimaler

Stimulation zu beeinflussen. Im Gegensatz dazu inhibiert Typ I IFN die Proliferation von naiven T-Zellen nach suboptimaler TZR-Stimulation.



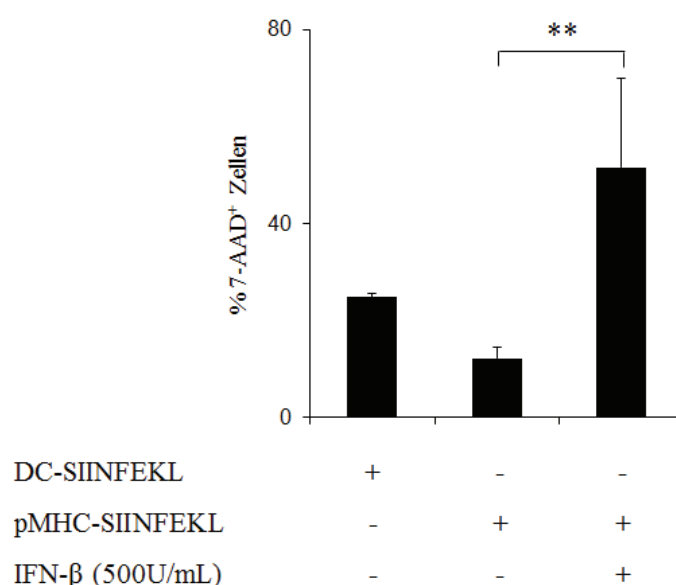
**Abbildung 11 IFN-β Stimulation inhibiert die Proliferation bei suboptimaler T Zell Rezeptor Stimulation**

$2 \times 10^6$  aufgereinigte OT-I  $CD8^+$  T-Zellen wurden mit CFSE gefärbt und für eine Stunde mit 500U/mL IFN $\beta$  behandelt oder unbehandelt gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen (c) von immobilisierten CD3 $\epsilon$  Antikörpern für 72 Stunden inkubiert. Die Proliferation wurde anhand des CFSE Gehalts der Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Daten sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente.

### 3.3 Einfluss von Typ I IFN auf das Überleben von T-Zellen

Die beobachtete Inhibition der Proliferation von  $CD8^+$  T-Zellen durch Typ I IFN könnte entweder auf einen verzögerten bzw. blockierten Zellzyklus oder auf einen verstärkten Zelltod zurückzuführen sein. Typ I IFN kann direkt nach Virus-Infektionen eine transiente Lymphopenie induzieren<sup>71,72,87</sup>. Dabei zeigen speziell  $CD8^+$  T-Zellen einen erhöhten Zelltod durch die Induktion von Apoptose<sup>71</sup>. Es sollte daher überprüft werden, ob eine IFN-Stimulation den Tod von T-Zellen induziert. OT-I T-Zellen wurden unbehandelt oder nach

einstündiger Vorbehandlung mit 500U/mL IFN- $\beta$  mit SIINFEKL-Streptameren für 72 Stunden stimuliert und anschließend mit 7-AAD, welches mit der DNA toter Zellen interkaliert, gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil toter Zellen bestimmt. Nach drei Tagen wiesen T-Zellen, die mit SIINFEKL-Peptid-beladenen DCs stimuliert wurden, einen Anteil von ca. 30% toter Zellen auf. Die Stimulation mit SIINFEKL-Streptameren führte zu einem geringeren Anteil toter Zellen. Wurden die Zellen mit IFN vorstimuliert, erhöhte sich der Anteil toter Zellen auf ungefähr 60% (*Abbildung 12*). Die Vorstimulation von T-Zellen mit IFN- $\beta$  verringert somit das Überleben von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach TZR-Stimulation. Dieses verminderte Überleben von T-Zellen könnte die Ursache für die beobachtete, verminderte Proliferation sein



**Abbildung 12 IFN- $\beta$  induziert Zelltod von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

2 x 10<sup>6</sup> aufgereinigte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen und anschließend mit SIINFEKL-Peptid-beladenen CD11c<sup>+</sup> DCs oder SIINFEKL-Streptameren für 72 Stunden stimuliert. Der Anteil toter Zellen wurde mittels 7-AAD-Färbung und Durchflusszytometrie bestimmt. Daten zeigen die Prozentzahlen von 7-AAD<sup>+</sup> T-Zellen und sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. \*\*, p < 0,01

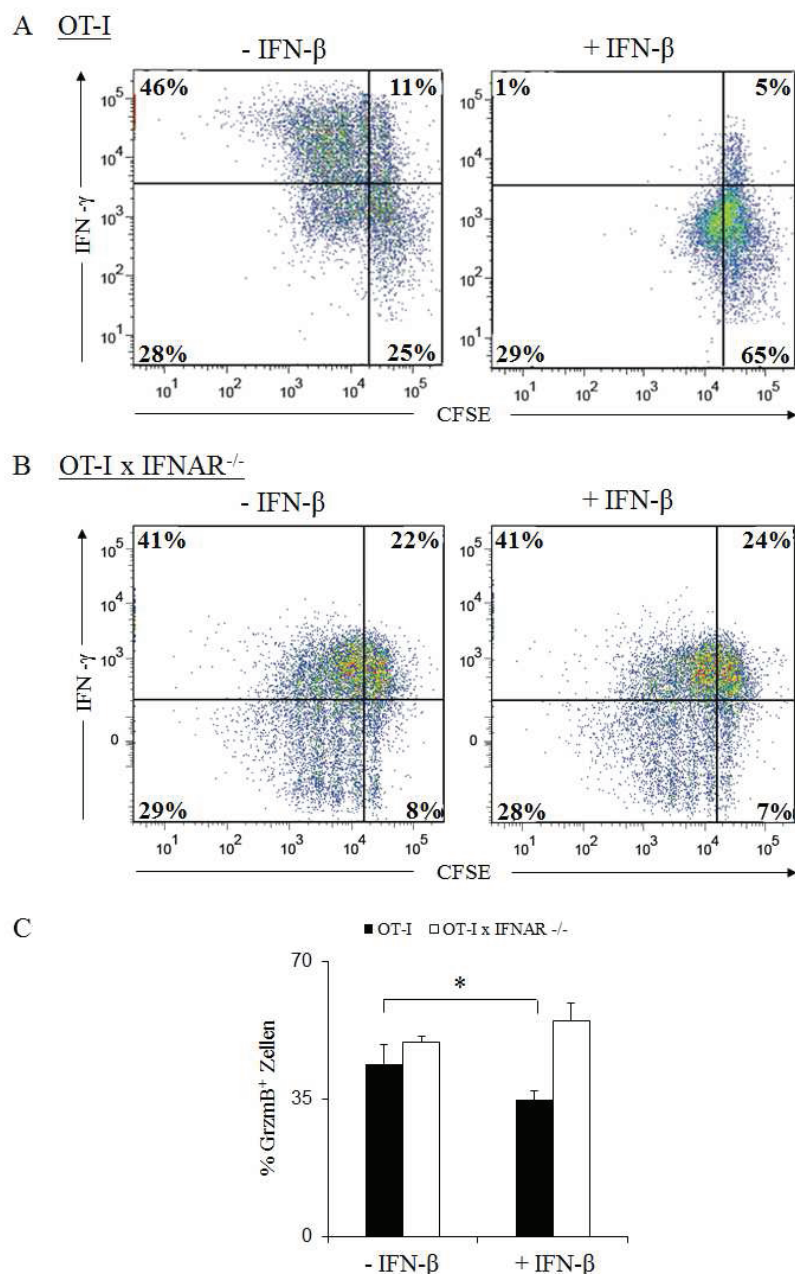
### 3.4 Einfluss von Typ I IFN auf die Effektorfunktionen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Die Aktivierung von T-Zellen induziert Proliferation und die Differenzierung zu Effektorzellen. Zytotoxische T-Zellen haben verschiedene Strategien entwickelt, um Zielzellen indirekt oder direkt zu töten. So werden verschiedene Zytokine, wie IFN- $\gamma$ , produziert, um Immunzellen zu stimulieren oder zytotoxisch auf die Zielzellen zu wirken. Des Weiteren setzen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach dem Erkennen von Zielzellen Zytotoxine, wie Perforin und Granzym B, frei oder exprimieren Liganden, die an Todesrezeptoren, wie Fas oder TRAILR, binden. Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine IFN-Vorstimulation auf die Ausbildung dieser Effektorfunktionen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen hat.

#### 3.4.1 Typ I IFN inhibiert die Expression von IFN- $\gamma$ und Granzym B

Verschiedene Publikationen zeigen, dass Typ I IFN durch eine verstärkte Expression der Effektormoleküle IFN- $\gamma$  und Granzym B, die Fähigkeit Zielzellen zu töten verbessern kann<sup>27,62</sup>. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass Typ I IFN die IFN- $\gamma$ -Expression abhängig vom IFNAR und STAT1 sowohl in NK- als auch in T-Zellen inhibiert<sup>74</sup>.

Um den Effekt einer IFN-Vorstimulation auf die Expression von IFN- $\gamma$  und Granzym B zu untersuchen, wurden OT-I T-Zellen mit CFSE gefärbt und für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Zellen mit SIINFEKL-Streptameren für 72 Stunden stimuliert und die Proliferation sowie IFN- $\gamma$ - und Granzym B-Expression mittels intrazellulärer Zytokinfärbung analysiert. Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte spezifisch auf Typ I IFN zurückzuführen sind, wurden naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus IFNAR-defizienten OT-I-Mäusen entsprechend stimuliert und analysiert.



**Abbildung 13 Typ I IFN-Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen inhibiert die Expression von IFN- $\gamma$  und Granzym B**

2 x 10<sup>6</sup> aufgereinigte OT-I oder OT-I x IFNAR<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit CFSE gefärbt und für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen und anschließend für 72 Stunden mit SIINFEKL-Streptameren inkubiert. Daraufhin erfolgte eine intrazelluläre Zytokinfärbung für IFN- $\gamma$  sowie Granzym B. Proliferation sowie die Expression von IFN- $\gamma$  und Granzym B wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. A Proliferation und IFN- $\gamma$ -Expression von OT-I T-Zellen. B Proliferation und IFN- $\gamma$ -Expression von OT-I x IFNAR<sup>-/-</sup> T-Zellen. C Daten zeigen Prozentzahlen Granzym B<sup>+</sup> Zellen  $\pm$  SD (n=3) \* p < 0,05.

OT-I T-Zellen, die nicht mit Typ I IFN stimuliert wurden, zeigten eine starke Proliferation, wobei mehr als die Hälfte aller Zellen IFN- $\gamma$  exprimierte. Nur ein kleiner Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die mit IFN- $\beta$  vorstimuliert wurden, proliferierte und nur 6% aller Zellen produzierten

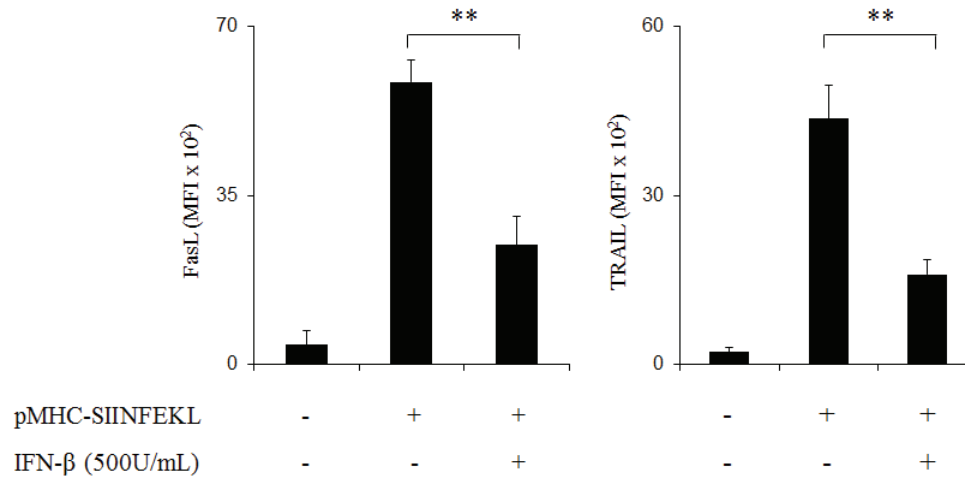


IFN- $\gamma$  (*Abbildung 13A*). IFNAR-defiziente OT-I T-Zellen zeigten nach TZR-Stimulation ebenfalls eine starke Proliferation und 63% der T-Zellen exprimierten IFN- $\gamma$ . Eine Vorstimulation mit IFN- $\beta$  hatte hier keinen Effekt auf die Proliferation sowie die Fähigkeit IFN- $\gamma$  zu produzieren (*Abbildung 13B*). Ungefähr 45% der OT-I T-Zellen, die mit SIINFEKL-Streptameren stimuliert wurden, produzierten Granzym B, während die Vorstimulation mit IFN- $\beta$  die Expression dieses Effektormoleküls signifikant vermindert hatte. Auch die Hälfte der OT-I T-Zellen aus IFNAR-defizienten Mäusen exprimierten Granzym B. Eine IFN-Vorstimulation hatte hier keinen Einfluss auf die Granzym B-Expression (*Abbildung 13C*). Die Daten zeigen, dass eine Vorstimulation von naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Typ I IFN die Expression der Effektormoleküle IFN- $\gamma$  und Granzym B hemmt.

### 3.4.2 Geringere Expression von FasL & TRAIL nach IFN-Stimulation

Effektorzellen können über Todesrezeptoren Apoptose in Zielzellen induzieren. CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren u.a. den Fas Liganden (FasL) und den TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL), die nach der Bindung an die entsprechenden Rezeptoren Caspase-abhängig Apoptose in Zielzellen induzieren<sup>34</sup>. Um den Einfluss von Typ I IFN auf die Expression von FasL und TRAIL zu untersuchen, wurden OT-I T-Zellen für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen und anschließend mit SIINFEKL-Streptameren für 72 Stunden stimuliert. Mittels Durchflusszytometrie wurden daraufhin die Expression von FasL und TRAIL analysiert. Unstimulierte OT-I T-Zellen wiesen eine sehr geringe Expression von FasL und TRAIL auf, während T-Zellen, die nur über den TZR stimuliert wurden, eine starke Expression beider Liganden aufwiesen. IFN-vorstimulierte T-Zellen exprimierten ebenfalls FasL und TRAIL. Diese Expression war jedoch im Vergleich zu Zellen, die nicht mit IFN behandelt wurden, signifikant geringer (*Abbildung 14*). Typ I IFN inhibiert daher die

Expression der Todes-Liganden FasL und TRAIL. Dies lässt vermuten, dass IFN-stimulierte T-Zellen ein geringeres Potential, Zielzellen zu töten, aufweisen.



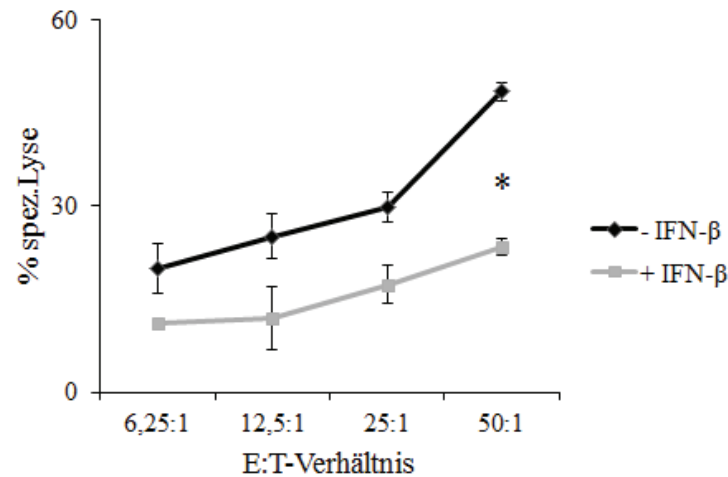
**Abbildung 14 Typ I IFN vermindert die Expression der Todes-Liganden FasL und TRAIL**

$2 \times 10^6$  aufgereinigte OT-I  $CD8^+$  T-Zellen wurden für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen und anschließend für 72 Stunden mit SIINFEKL-Streptameren inkubiert. Die Expression von FasL und TRAIL wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Daten zeigen MFI  $\pm$  SD (n=3) \*\*  $p < 0,01$ .

### 3.4.3 IFN-vorstimulierte T-Zellen zeigen verminderte Zytotoxizität

Die Vorstimulation von naiven  $CD8^+$  T-Zellen mit IFN- $\beta$  verringert die Expression von IFN $\gamma$ , Granzym B sowie der Todesliganden FasL und TRAIL, was auf ein vermindertes Tötungspotential hindeutet. Daher sollte überprüft werden, ob diese verringerte Expression von Effektormolekülen Auswirkungen auf die Fähigkeit hat, Zielzellen zu töten. Hierfür wurde ein *in vitro* CTL-Assay durchgeführt, bei dem das Töten von Zielzellen durch Effektor-Zellen ermittelt wird. OT-I T-Zellen wurden als Effektor-Zellen für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen und anschließend für 48 Stunden mit SIINFEKL-Streptameren stimuliert. Zielzellen wurden mit dem SIINFEKL-Peptid beladen und mit CFSE gefärbt. Die Effektor-Zellen wurden anschließend mit den Zielzellen in verschiedenen Verhältnissen zueinander für 16 Stunden inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit 7-AAD

gefärbt, um den Anteil toter Zellen zu bestimmen. Die spezifische Lyse der Zielzellen wurde daraufhin anhand von 7-AAD-CFSE doppelpositiven Zielzellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt und berechnet.



#### Abbildung 15 Verringerte Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach IFN-Stimulation

Aufgereinigte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen (E) wurden für eine Stunde mit 500U/mL IFN-β stimuliert oder unbehandelt belassen und anschließend für 48 Stunden mit SIINFEKL-Streptameren inkubiert. EL-4-Zellen wurden als Zielzellen (T) verwendet, mit CFSE gefärbt und dem SIINFEKL-Peptid inkubiert. T-Zellen und Zielzellen wurden für 16 Stunden in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 7-AAD gefärbt und die Prozentzahl 7-AAD<sup>+</sup> und CFSE<sup>+</sup> Zielzellen bestimmt. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus Triplikat-Kulturen. Daten repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

OT-I T-Zellen, die mit SIINFEKL-Streptameren stimuliert wurden, führten zur Lyse der Zielzellen. Der prozentuale Anteil der spezifischen Lyse nahm abhängig vom Verhältnis von Effektor (E)- zu Zielzellen (T) zu und erreichte 50% bei einem E:T-Verhältnis von 50:1. IFN-vorstimulierte Zellen besaßen ebenfalls die Fähigkeit Zielzellen zu töten. Diese war jedoch im Vergleich zu nicht IFN-stimulierten Zellen wesentlich geringer und erreichte bei einem E:T-Verhältnis von 50:1 nur 25% (*Abbildung 15*). Typ I IFN vermindert somit die Fähigkeit von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Zielzellen zu töten.

### 3.5 Einfluss von Typ I IFN auf den Aktivierungs- und Differenzierungszustand von T-Zellen

Die Stimulation von T-Zellen über den TZR führt zur Aktivierung und Differenzierung zu Effektor- und Gedächtnis-Zellen. Sowohl die Aktivierung als auch die Differenzierung von T-Zellen ist durch die Synthese und Expression bestimmter Aktivierungs- und Gedächtnis-Marker gekennzeichnet. Über die Analyse der Expression dieser Oberflächenmarker sollte der Einfluss von Typ I IFN auf den Aktivierungs- und Differenzierungszustand von T-Zellen untersucht werden.

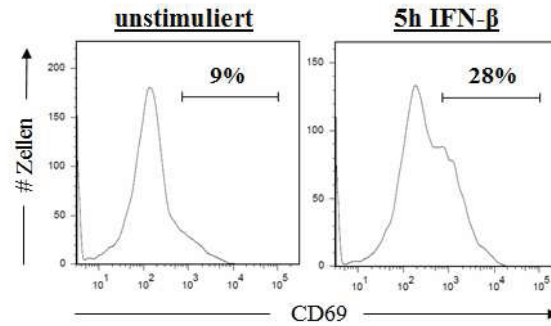
#### 3.5.1 Typ I IFN hat keinen negativen Einfluss auf die Expression des frühen Aktivierungsmarker CD69

Unmittelbar nach der Aktivierung von T-Zellen wird CD69 als einer der ersten Oberflächenmarker exprimiert. Bereits ein bis zwei Stunden nach TZR-Stimulation kann CD69 auf der Oberfläche von T-Zellen nachgewiesen werden, wobei eine Expression von bis zu drei Tagen nach der Aktivierung möglich ist<sup>28</sup>. Es ist bekannt, dass Typ I IFN die Expression von CD69 transient in T-Zellen induzieren kann<sup>88</sup>. Dieser Zustand wird auch als „partial lymphocyte activation“ bezeichnet und führt möglicherweise zu einem erhöhten Schwellenwert für eine Antigen-spezifische Stimulation von T-Zellen<sup>88</sup>. Um den Effekt von Typ I IFN auf die Expression von CD69 zu untersuchen, wurden OT-I T-Zellen für fünf Stunden mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen. Unbehandelte Zellen, wiesen keine Expression von CD69 auf, wohingegen 28% der T-Zellen, die für fünf Stunden mit IFN- $\beta$  stimuliert wurden, eine Expression von CD69 zeigten (*Abbildung 16A*). Typ I IFN ist daher auch in unserem Versuchsansatz in der Lage die Expression von CD69 zu induzieren.

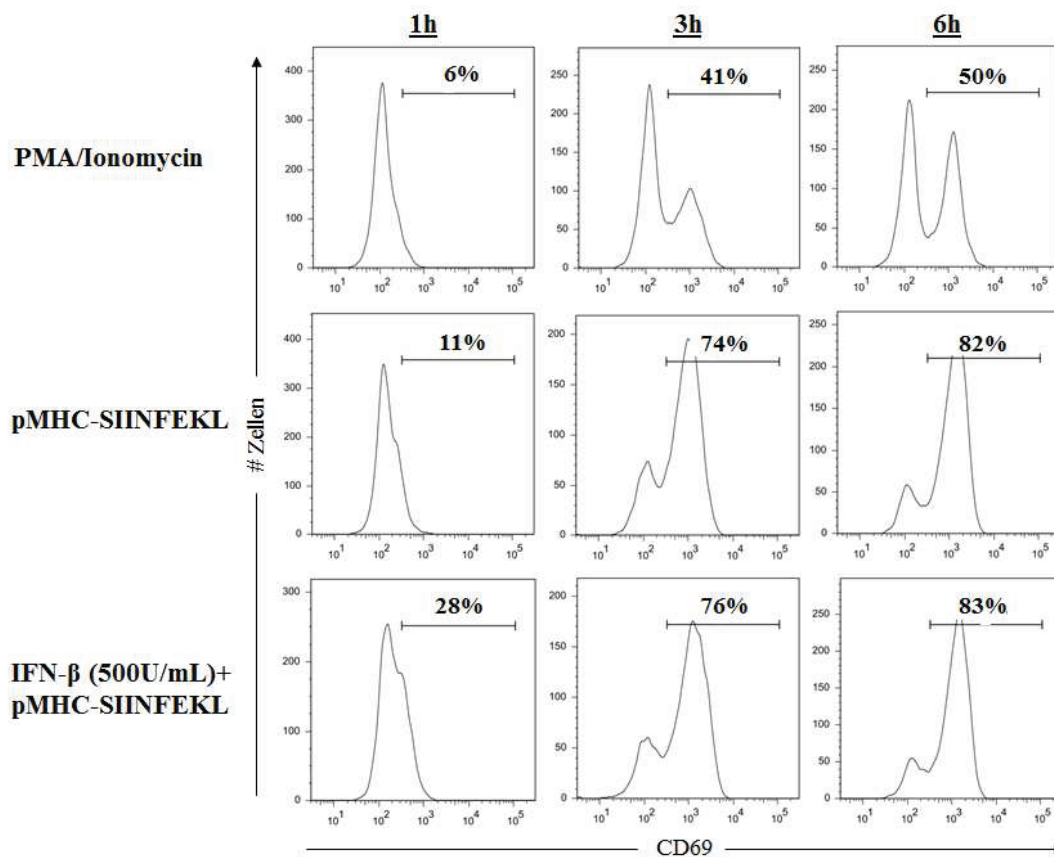
Um zu überprüfen, welchen Einfluss Typ I IFN auf die Expression von CD69 nach TZR-Stimulation hat, wurden OT-I T-Zellen für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  behandelt oder unbehandelt belassen und anschließend mit SIINFEKL-Streptameren aktiviert. Die Expression von CD69 wurde daraufhin zu verschiedenen Zeitpunkten nach TZR-Stimulation mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit PMA (Phorbol-Myristat-Acetat) und Ionomycin behandelt, welche durch die Aktivierung der Protein Kinase C (PKC) zur Expression von CD69 in T-Zellen führt<sup>28</sup>. Eine Stunde nach PMA/Ionomycin-Stimulation exprimierten OT-I T-Zellen jedoch noch kein CD69. Nach dreistündiger Stimulation zeigten bereits 41% der Zellen eine Expression von CD69 und nach sechs Stunden PMA/Ionomycin-Stimulation exprimierten 50% der Zellen CD69. T-Zellen, die mit den SIINFEKL-Streptameren allein stimuliert wurden, zeigten nach einer Stunde bereits eine leicht erhöhte Expression von CD69. Nach drei Stunden exprimierten 74% der Zellen CD69, während nach sechs Stunden ein erneuter leichter Anstieg auf 82% vorhanden war. Zellen, die mit IFN vorbehandelt wurden, zeigten eine Stunde nach TZR-Stimulation eine leicht verstärkte CD69-Expression im Vergleich zu nur TZR-stimulierten Zellen. Der Anteil der Zellen, die CD69 nach drei und sechs Stunden exprimierte, war jedoch mit dem von nur TZR-stimulierten Zellen vergleichbar (*Abbildung 16 B*). Die Expression von CD69 konnte noch drei Tage nach TZR-Stimulation nachgewiesen werden, wobei keine Unterschiede zwischen den verschieden behandelten T-Zellen vorhanden waren (*Daten nicht gezeigt*). Eine Stimulation von T-Zellen mit Typ I IFN induziert somit transient eine leicht erhöhte Expression von CD69, wobei bereits nach wenigen Stunden keine Unterschiede mehr zwischen IFN-behandelten und unbehandelten Zellen vorhanden sind. Typ I IFN hat somit keinen negativen Einfluss auf die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69.

A



B



**Abbildung 16 Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 nach TZR-Stimulation wird durch IFN-Stimulation nicht negativ beeinflusst**

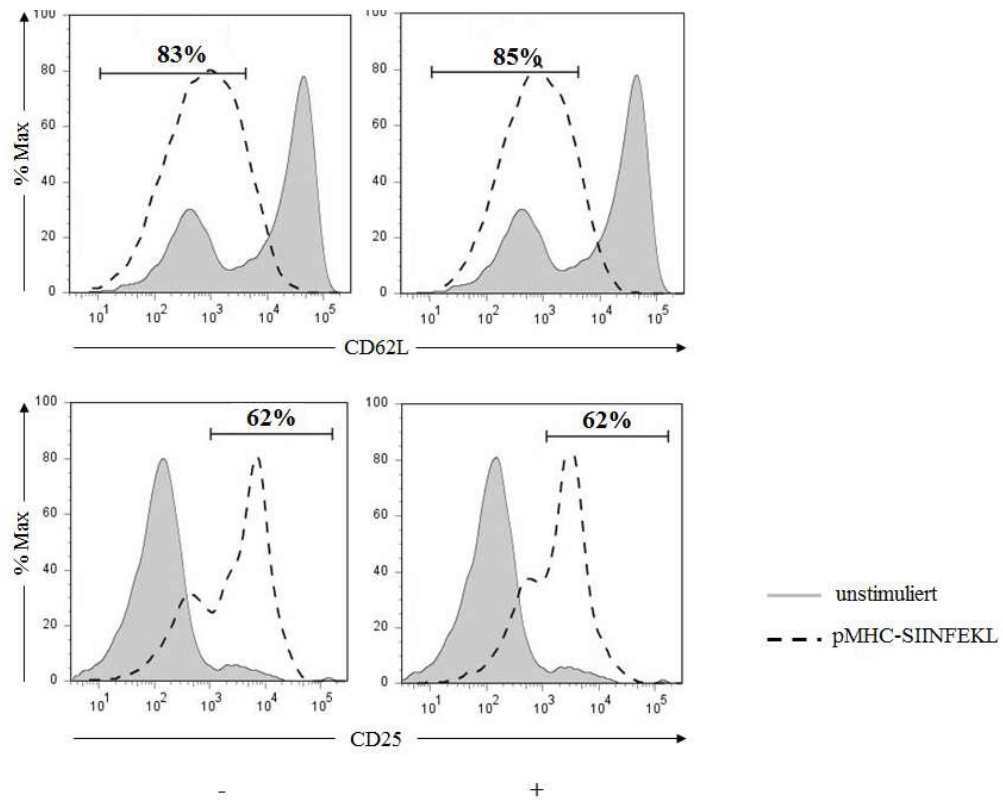
$2 \times 10^6$  aufgereinigte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden für eine Stunde mit 500U/mL IFN-β stimuliert oder unbehandelt belassen und anschließend mit SIINFEKL-Streptameren für eine, drei oder sechs Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit PMA/Ionomycin (je 1μg/mL) für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Die Expression von CD69 wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. A Histogramme zeigen die Expression von CD69 von unstimulierten und für fünf Stunden mit IFN-stimulierten Zellen. B Histogramme zeigen die Expression von CD69 von PMA/Ionomycin, TZR- sowie IFN- und TZR-stimulierten Zellen. Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

### 3.5.2 Die Expression der Aktivierungsmarker CD62L und CD25 wird durch Typ I IFN nicht beeinflusst

Neben dem frühen Aktivierungsmarker CD69 exprimieren aktivierte T-Zellen weitere Oberflächenmarker. Naive T-Zellen exprimieren CD62L, dessen Expression nach der Aktivierung von T-Zellen herunterreguliert wird, wodurch aktivierte T-Zellen einen CD62L<sup>low</sup>-Phänotyp aufweisen<sup>30,31</sup>. Die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen induziert außerdem die Expression von CD25, der  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors. Die Bindung von IL-2 an diesen Rezeptor ist für die Proliferation und Homeostase von T-Zellen notwendig.

Um den Effekt einer IFN-Stimulation auf die Expression von CD62L und CD25 zu untersuchen, wurden OT-I T-Zellen für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Zellen mit SIINFEKL-Streptameren für 72 Stunden inkubiert und die Expression von CD62L und CD25 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Unstimulierte, naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen wiesen einen CD62L<sup>high</sup> und CD25<sup>low</sup>-Phänotyp auf. Die Stimulation des TZR führte zur Reduktion der CD62L-Expression und zur Induktion der CD25-Expression. Die Vorstimulation mit IFN- $\beta$  hatte keinen Einfluss auf diesen CD62L<sup>low</sup> und CD25<sup>high</sup>-Phänotyp (*Abbildung 17*).

Während Typ I IFN die Proliferation und Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen hemmt, wird die Aktivierung von T-Zellen nicht beeinflusst.



**Abbildung 17 Typ I IFN hat keinen Effekt auf die Expression der Aktivierungsmarker CD62L und CD25**

$2 \times 10^6$  aufgereinigte OT-I  $CD8^+$  T-Zellen wurden für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen und anschließend mit SIINFEKL-Streptameren für 72 Stunden inkubiert. Gefüllte Histogramme zeigen die Expression von CD62L bzw. CD25 in unstimulierten Zellen an Tag 0 der Stimulation. Gestrichelte Histogramme zeigen TZR-stimulierte T-Zellen mit und ohne IFN-Vorbehandlung. Die Expression von CD62L und CD25 wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

### 3.5.3 Einfluss von Typ I IFN auf die Differenzierung zu $CD44^{hi}$ T-Gedächtniszellen

Nach ihrer Aktivierung proliferieren  $CD8^+$  T-Zellen und bilden Effektorfunktionen aus, um infizierte Zellen zu eliminieren. Nach dem Bekämpfen der Infektion überleben T-Gedächtniszellen, die eine erneute Infektion schneller und effektiver bekämpfen können. Naive T-Zellen zeigen eine geringe Expression des Adhäsionsmoleküls CD44. Nach ihrer Aktivierung wird die Expression von CD44 induziert und bleibt erhalten.

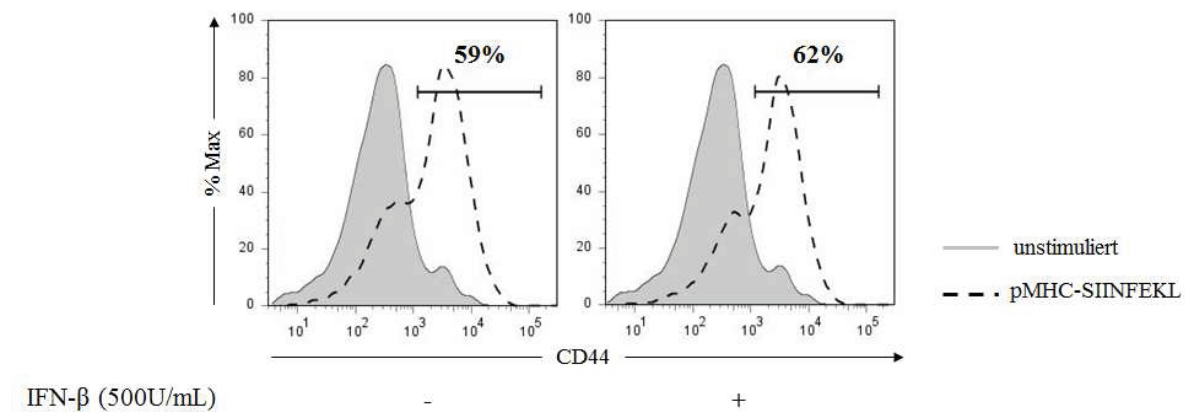
Um zu überprüfen, ob Typ I IFN die Expression von CD44 beeinflusst, wurden OT-I T-Zellen für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  behandelt oder unbehandelt belassen und anschließend



für 72 Stunden mit SIINFEKL-Streptameren inkubiert. Daraufhin wurde der Anteil an T-Zellen, die einen CD44<sup>high</sup>-Phänotyp aufwiesen, mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Unstimulierte, naive OT-I T-Zellen zeigten keine Expression von CD44. Nach 72 Stunden Stimulation mit SIINFEKL-Streptameren zeigten die T-Zellen eine Expression von CD44. IFN-vorstimulierte Zellen zeigten die gleiche Expression von CD44 wie nicht mit IFN behandelte Zellen (Abbildung 18).

Typ I IFN haben keinen Einfluss auf die Expression des T-Gedächtnis-Markers CD44 und somit auf die Differenzierung zu Gedächtniszellen.



**Abbildung 18 Die Expression des Gedächtnis-Markers CD44 wird durch IFN-Stimulation nicht beeinflusst**

$2 \times 10^6$  aufgereinigte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden für eine Stunde mit 500U/mL IFN-β stimuliert oder unbehandelt belassen und anschließend mit SIINFEKL-Streptameren für 72 Stunden inkubiert. Gefüllte Histogramme zeigen die Expression von CD44 in unstimulierten Zellen an Tag 0 der Stimulation. Gestrichelte Histogramme zeigen TZR-stimulierte T-Zellen mit und ohne IFN-Vorbehandlung. Die Expression von CD44 wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

### 3.6 Einfluss von Typ I IFN auf IL-2

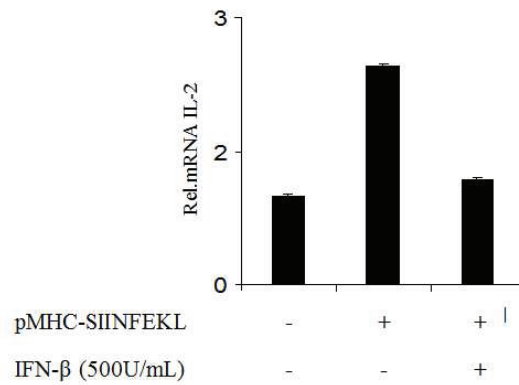
Interleukin-2 (IL-2) spielt eine zentrale Rolle bei der klonalen Expansion von aktivierten T-Zellen. Diese Funktion wird durch Bindung an den spezifischen Oberflächen-Rezeptor (IL-2 Rezeptor) vermittelt. Die Aktivierung von T-Zellen über den TZR induziert die Expression von IL-2 und den entsprechenden Rezeptor. IL-2 wirkt daraufhin über die Interaktion zwischen IL-2 und dem IL2-R autokrin und parakrin auf T-Zellen und induziert verschiedene Signalwege, die entscheidend für Homeostase und Proliferation von T-Zellen sind<sup>32</sup>.

#### 3.6.1 Typ I IFN hemmt die Induktion und Produktion von IL-2

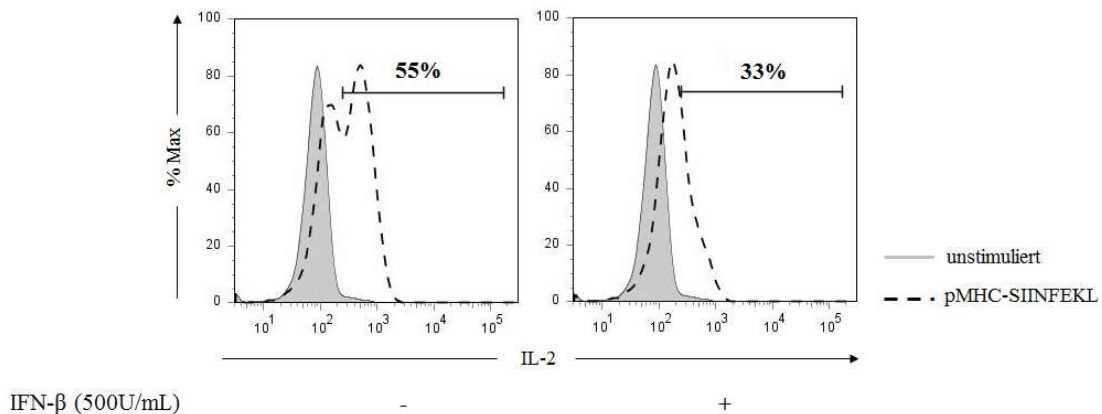
Aufgrund der beobachteten antiproliferativen Effekte von Typ I IFN auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen, sollte untersucht werden, ob die Induktion und Expression von IL-2 durch eine IFN-Stimulation beeinflusst wird. OT-I T-Zellen wurden für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  behandelt oder unbehandelt belassen und anschließend mit SIINFEKL-Streptameren stimuliert. Zwölf Stunden nach TZR-Stimulation wurde mittels quantitativer PCR die mRNA-Induktion von IL-2 bestimmt. Die Werte von unstimulierten Zellen wurden gleich 1 gesetzt. Die Stimulation mit SIINFEKL-Streptameren führte zu einer fast dreifach erhöhten Induktion von IL-2, während bei IFN-stimulierten Zellen IL-2 nur geringfügig induziert wurde (*Abbildung 19A*).

Zusätzlich wurde die Expression von IL-2 72 Stunden nach TZR-Stimulation mittels intrazellulärer Zytokinfärbung im Durchflusszytometer analysiert. Unstimulierte Zellen exprimierten kein IL-2. Die Stimulation des TZR induzierte die Expression von IL-2, während eine Vorstimulation mit IFN- $\beta$  den Anteil IL-2-produzierender Zellen deutlich verminderte (*Abbildung 19B*).

A



B



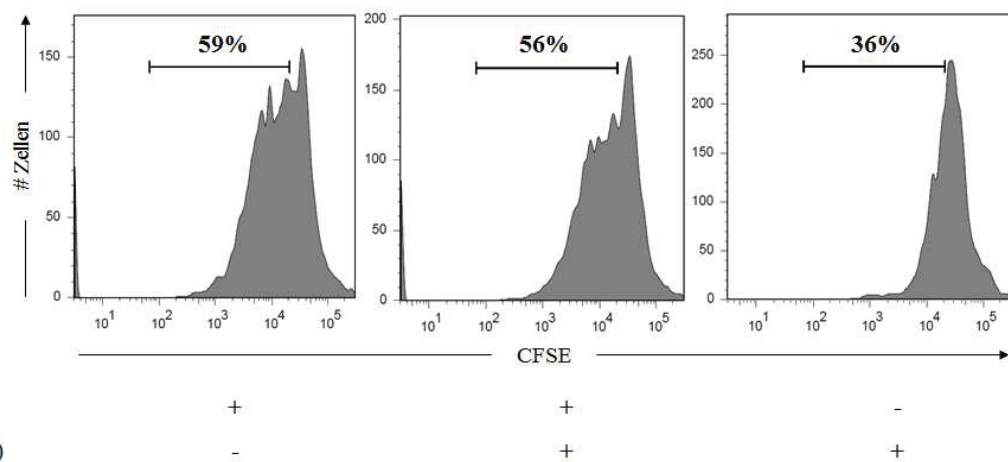
### Abbildung 19 Verminderte IL-2 mRNA Induktion und Expression nach IFN-Stimulation

$2 \times 10^6$  aufgereinigte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen und anschließend mit SIINFEKL-Streptameren inkubiert. A RealTime-PCR-Analyse der IL2 mRNA-Induktion 12 Stunden nach TZR-Stimulation. B Intrazelluläre Zytokinfärbung für IL-2 72 Stunden nach Stimulation mit SIINFEKL-Streptameren. Gefüllte Histogramme zeigen Expression in unstimulierten Zellen. Gestrichelte Histogramme zeigen TZR-stimulierte Zellen mit und ohne IFN-Vorbehandlung. Expression wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Die Stimulation von T-Zellen mit Typ I IFN führt somit zu einer verminderten IL-2 mRNA-Induktion 12 Stunden nach TZR-Stimulation und daraus resultierend zu einer verminderten Expression 72 Stunden nach TZR-Stimulation. Die geringeren Mengen an produziertem IL-2 könnten ein möglicher Grund für die IFN-vermittelte Inhibition der Proliferation sein.

### 3.6.2 Die IFN-induzierte Inhibition der T-Zell-Proliferation kann durch externes IL-2 aufgehoben werden

IL-2 ist für die Proliferation von T-Zellen essentiell. Um zu überprüfen, ob die verminderte IL-2 mRNA-Induktion und Expression die Ursache für die Inhibition der Proliferation ist, wurden naive OT-I T-Zellen mit CFSE gefärbt und für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend erfolgte die Stimulation mit SIINFEKL-Streptameren für 72 Stunden. Über die gesamte Stimulationsdauer wurden die Zellen in Anwesenheit von 10ng/mL IL-2 kultiviert. Bei dieser IL-2-Konzentration wird in unstimulierten T-Zellen keine Proliferation induziert, aber das Überleben gesichert. Die Proliferation wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert.



**Abbildung 20 IL-2 hebt die IFN-vermittelte Inhibition der Proliferation auf**

$2 \times 10^6$  aufgereinigte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit CFSE gefärbt, für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen und anschließend mit SIINFEKL-Streptameren für 72 Stunden inkubiert. Zu den Zellen wurde über die gesamte Stimulationsdauer 10ng/mL IL-2 gegeben. Die Proliferation wurde anhand des CFSE-Gehaltes mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

T-Zellen, die mit SIINFEKL-Streptameren und IL-2 stimuliert wurden, wiesen eine starke Proliferation auf. Ungefähr 60% der T-Zellen hatten proliferiert. IFN-vorstimulierte T-Zellen, die ebenfalls zusätzlich mit IL-2 inkubiert wurden, zeigten eine vergleichbare Proliferation, während Zellen, die nicht mit IL-2 behandelt wurden, deutlich weniger proliferiert hatten. (Abbildung 20). Diese Daten lassen vermuten, dass die IFN-vermittelte Inhibition der T-Zell-

Proliferation sowie das verminderte Überleben der T-Zellen auf die verminderte Produktion von IL-2 zurückzuführen ist.

### 3.7 Der Einfluss von Typ I IFN auf den TZR-Signalweg

Die Stimulation des TZR führt zur Aktivierung verschiedener Signalwege, wie z.B. dem Anstieg intrazellulären Kalziums oder der Aktivierung von Protein Kinase C, NFκB und Ras-MAP-Kinasen. Die induzierten Signalwege führen zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, NFAT und Rel-Proteinen, die letztendlich die Expression von Genen induzieren, die Proliferation, Differenzierung, Anergie oder Apoptose regulieren<sup>44</sup>.

Typ I IFN induziert neben dem JAK-STAT-Signalweg auch Signalmoleküle, die vom TZR zur Signaltransduktion genutzt werden, wie CD45, Lck und Zap70<sup>75</sup> sowie PKC-θ<sup>77</sup>. Es sollte daher überprüft werden, ob Typ I IFN TZR-induzierte Signalwege beeinflussen.

#### 3.7.1 Der Kalzium-Signalweg

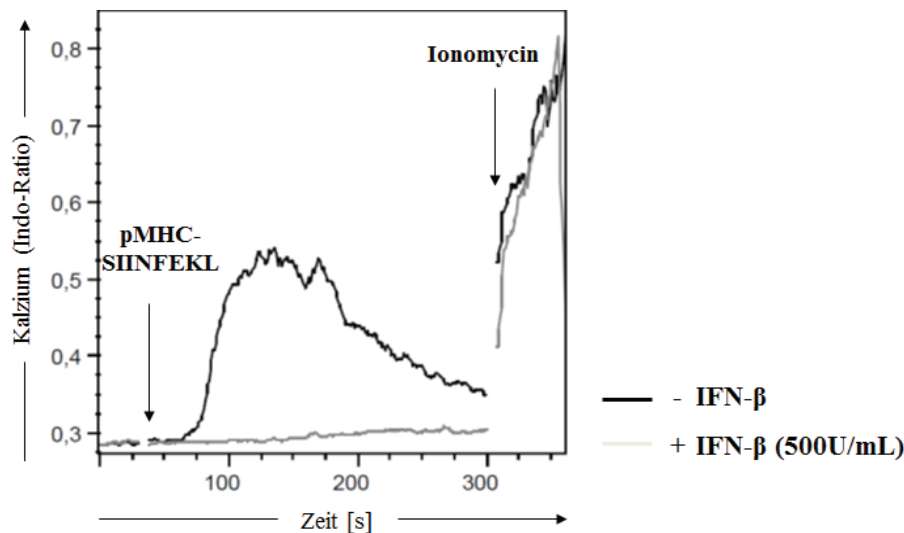
Die Bindung von Liganden an den TZR führt zur Aktivierung von PLCγ1, die PIP<sub>2</sub> zu IP<sub>3</sub> und DAG hydrolysiert. IP<sub>3</sub> induziert den Efflux von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem ER, was letztendlich zum Influx extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Ionen führt. Dieser Ca<sup>2+</sup>-Influx aktiviert u.a. den Calcineurin/NFAT-Signalweg, der z.B. IL-2 induziert und somit entscheidend für die Proliferation von T-Zellen ist<sup>47, 48</sup>. Zusätzlich spielen Ca<sup>2+</sup>-Signale eine wichtige Rolle bei weiteren TZR-induzierten Signalwegen, wie der Ras-MAPK-Kaskade oder der Aktivierung von NFκB<sup>89</sup>.

### 3.7.1.1 Typ I IFN inhibiert die TZR-vermittelte Kalzium-Mobilisierung

Aufgrund der beobachteten negativen Effekte einer IFN-Stimulation auf die Proliferation, Effektorfunktionen und die Produktion von IL-2 wurde geprüft, ob Typ I IFN den Kalzium-Signalweg als frühes Ereignis in der TZR-Signalkaskade beeinflusst.

Um den Anstieg intrazellulären Kalziums zu untersuchen, wurden OT-I T-Zellen mit Indo-1 gefärbt. Bei diesem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Farbstoff führt eine Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu einer Veränderung der emittierten Wellenlänge. Ohne gebundenes  $\text{Ca}^{2+}$  wird nach der Anregung im UV-Bereich blaue Fluoreszenz emittiert, während bei gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine Emission im violetten Farbbereich erfolgt. Über das Verhältnis von Violett zu Blau kann die Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über die Zeit dargestellt werden.

Nach der Färbung mit Indo-1 wurden naive T-Zellen für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurde die Kalzium-Mobilisierung mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dazu wurde zunächst für 20 Sekunden ohne Stimulus gemessen, daraufhin SIINFEKL-Streptamere zu den Zellen gegeben und die Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen analysiert. Am Ende jeder Messung wurde Ionomycin, welches zu einem unspezifischen Influx von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über Membranen führt, zu den Zellen gegeben, um einen maximalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx zu induzieren. Die Stimulation des TZR von unstimulierten T-Zellen mit Streptameren führte zum massiven Influx von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. T-Zellen, die zuvor mit IFN- $\beta$  stimuliert wurden, zeigten hingegen keine signifikante Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen nach Zugabe des TZR-Stimulus (*Abbildung 21*). Die Ergebnisse zeigen, dass Typ I IFN den TZR-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg inhibiert. Dies lässt vermuten, dass die beobachtete verminderte Expression von IL-2 möglicherweise auf den fehlenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx nach IFN-Stimulation zurückzuführen ist.



**Abbildung 21 IFN- $\beta$  inhibiert den T-Zell-Rezeptor-vermittelten Kalzium Influx**

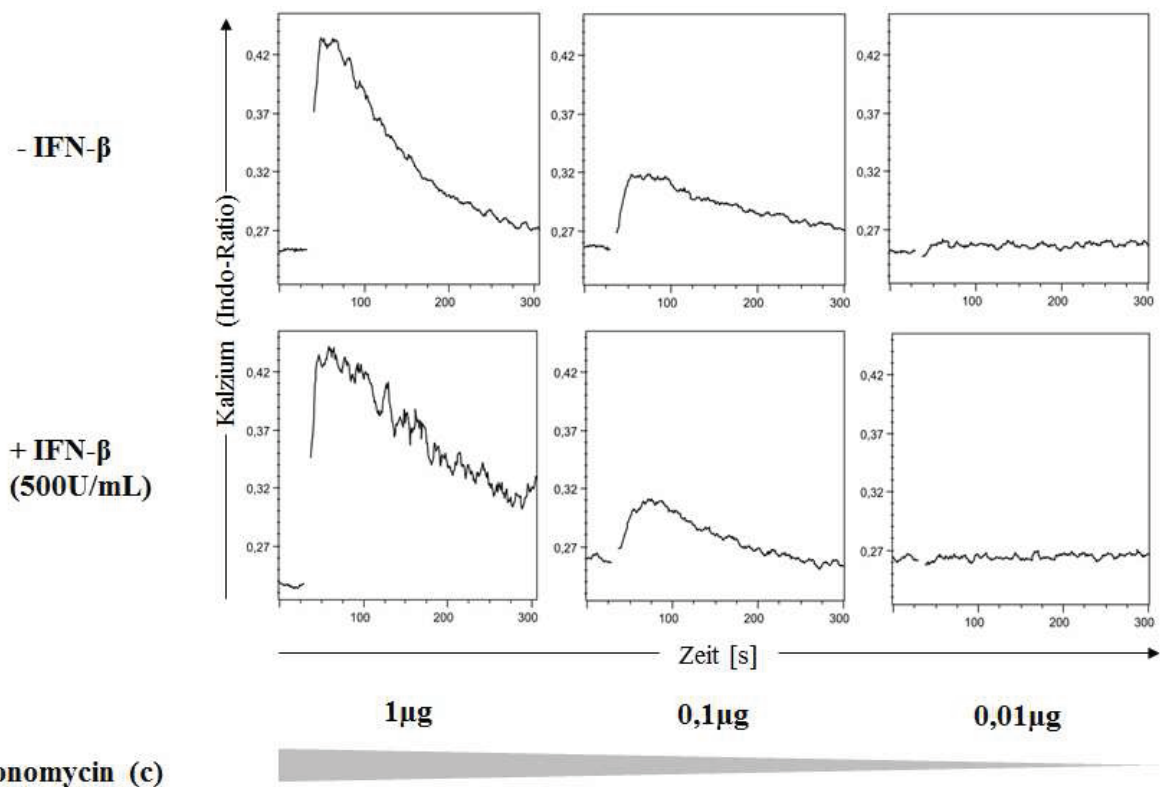
$2 \times 10^6$  aufgereinigte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Indo-1 gefärbt und für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen. Die Mobilisierung von Kalzium-Ionen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Nach 20 Sekunden wurden SIINFEKL-Streptamere zu den Zellen gegeben und der TZR-vermittelte Kalzium-Influx gemessen. Zum Ende der Messung wurde Ionomycin zu den Zellen gegeben, um den maximalen Influx von Kalzium-Ionen zu erzielen. Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

### 3.7.1.2 Typ I IFN inhibiert spezifisch den TZR-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Influx

Der Kalzium-Signalweg ist ein biphasisches Ereignis. Zuerst erfolgt über die Phosphorylierung und Aktivierung verschiedener Signalmoleküle die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem ER, dem intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speicher. Diese Freisetzung führt dann zum Influx von extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ionen über Ca<sup>2+</sup>-Kanäle in der Plasmamembran. Es sollte untersucht werden, ob Typ I IFN über eine Inhibition der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle den TZR-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Influx inhibiert. Die Behandlung mit Ionomycin führt zu einem TZR-unabhängigen Transport von Ca<sup>2+</sup>-Ionen über Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, die in Zellmembranen lokalisiert sind<sup>47,48</sup>. Aus diesem Grund wurde der Einfluss einer IFN-Stimulation auf eine Ionomycin-induzierte Kalzium-Mobilisierung untersucht.

OT-I T-Zellen wurden mit Indo-1 gefärbt und für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt gelassen. Anschließend wurde die Kalzium-Mobilisierung nach Ionomycin-Gabe mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen

Konzentrationen Ionomycin stimuliert. In unstimulierten T-Zellen induzierte eine Konzentration von  $1\mu\text{g/mL}$  Ionomycin einen starken  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx. Auch geringere Mengen von  $0,1\mu\text{g/mL}$  konnten eine, wenn auch geringere  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung induzieren. Eine Konzentration von  $0,01\mu\text{g/mL}$  Ionomycin führte jedoch zu keinem Kalzium-Influx. Eine IFN-Stimulation vor der Gabe von Ionomycin hatte bei keiner eingesetzten Konzentration einen Einfluss auf die Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Abbildung 22). Typ IFN hat somit keinen Einfluss auf den Transport von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über Kalzium-Kanäle.



**Abbildung 22 Unspezifische  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung durch Ionomycin wird durch Typ I IFN nicht beeinflusst**

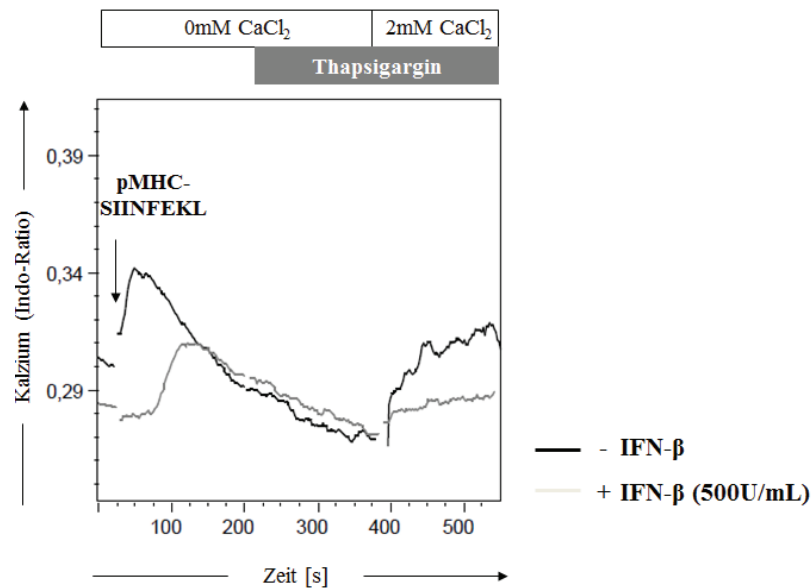
$2 \times 10^6$  aufgereinigte OT-I  $\text{CD8}^+$  T-Zellen wurden mit Indo-1 gefärbt und für eine Stunde mit  $500\text{U/mL}$  IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen. Die Mobilisierung von Kalzium-Ionen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Nach 20 Sekunden Messung wurden die angegebenen Konzentrationen Ionomycin zu den Zellen gegeben und der Kalzium-Influx gemessen. Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.



### 3.7.1.3 Die Freisetzung von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern wird durch Typ I IFN beeinflusst

Die Vorstimulation mit IFN- $\beta$  hatte keinen Einfluss auf den Influx von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über Kalzium-Kanäle in der Plasmamembran. Es sollte daher überprüft werden, ob Typ I IFN die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern beeinflusst. Hierfür wurden OT-I T-Zellen in EGTA-haltigen FACS-Puffer aufgenommen, um extrazellulär verfügbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu binden und somit die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern mittels Durchflusszytometrie zu untersuchen. Nach der Zugabe von SIINFEKL-Streptameren wurde Thapsigargin zu den Zellen gegeben. Thapsigargin blockiert in der ER-Membran befindliche SERCA-Pumpen, die für den Rücktransport von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das ER zuständig sind. Die Zugabe nach der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem ER ermöglicht eine vollständige Entleerung dieses Kalzium-Speichers, sodass Aussagen über die Effizienz der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem ER möglich sind. Am Ende jeder Messung wurden  $\text{CaCl}_2$ -Ionen zu den Zellen gegeben, um extrazellulär wieder  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zuzuführen und den Influx extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu überprüfen.

Die Stimulation von naiven T-Zellen mit SIINFEKL-Streptameren führte zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem ER. Die Behandlung mit Thapsigargin ermöglichte eine vollständige Entleerung des intrazellulären Speichers. Die Zugabe von extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in Form von  $\text{CaCl}_2$  führte daraufhin zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Die Stimulation von IFN-vorbehandelten T-Zellen führte im Vergleich zu einer verzögerten und leicht verringerten Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern. Die Zugabe von Thapsigargin führte hier ebenfalls zur vollständigen Leerung des ERs. Nach der Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  wurde jedoch ein deutlich verminderter Influx von extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in IFN-behandelten Zellen beobachtet (*Abbildung 23*). Typ I IFN führt somit zu einer verzögerten und verminderten Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern, die wiederum zu einem stark verminderten Influx extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen führt.



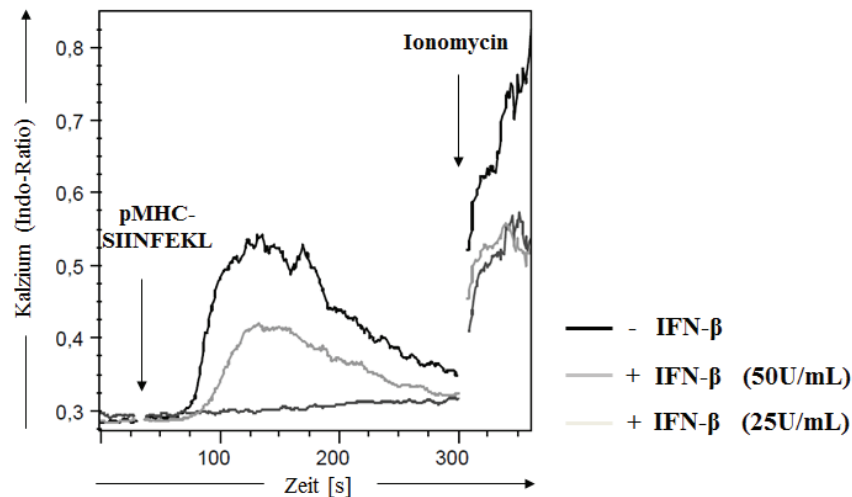
**Abbildung 23 IFN- $\beta$  führt zu verzögerter Kalzium-Mobilisierung aus intrazellulären Kalzium-Speichern**

$2 \times 10^6$  aufgereinigte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Indo-1 gefärbt und für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen und in EGTA-haltigen FACS-Puffer aufgenommen, um extrazelluläre Kalzium-Ionen zu binden. Die Mobilisierung von Kalzium-Ionen aus intrazellulären Kalzium-Speichern wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Nach 20 Sekunden wurden SIINFEKL-Streptamere zu den Zellen gegeben und der TZR-vermittelte intrazelluläre Kalzium-Influx gemessen. Um die vollständige Leerung intrazellulärer Speicher zu überprüfen, wurde anschließend Thapsigargin zu den Zellen gegeben. Zum Ende der Messung wurde CaCl<sub>2</sub> zu den Zellen gegeben, um extrazellulär Kalzium-Ionen zuzuführen. Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

#### 3.7.1.4 Geringe IFN- $\beta$ -Konzentrationen vermindern den TZR-vermittelten Kalzium-Signalweg

Es konnte gezeigt werden, dass hohe IFN-Konzentrationen notwendig sind, um die Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu inhibieren (Abbildung 8). Es sollte untersucht werden, ob geringere IFN-Konzentrationen ausreichend sind, um den TZR-vermittelten Kalzium-Influx zu beeinflussen. OT-I T-Zellen wurden mit Indo-1 gefärbt, für eine Stunde mit 500, 250, 125, 50 oder 25U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt gelassen und die Kalzium-Mobilisierung nach TZR-Stimulation mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Stimulation unbehandelter Zellen mit SIINFEKL-Streptameren induzierte einen starken Ca<sup>2+</sup>-Influx. Eine Vorbehandlung mit 500, 250, 125 und sogar 50U/mL IFN- $\beta$  inhibierte den TZR-vermittelten

Kalzium-Influx. Erst eine Vorstimulation mit einer sehr geringen Konzentration von 25U/mL IFN- $\beta$  führte zu einem TZR-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx, der jedoch im Vergleich zu unbehandelten Zellen vermindert war (Abbildung 24). Dies zeigt, dass im Gegensatz zur Inhibition der Proliferation bereits geringe Konzentrationen von IFN- $\beta$  den TZR-vermittelten Kalzium-Signalweg inhibieren.



**Abbildung 24 Geringe Konzentrationen IFN- $\beta$  vermindern den T-Zell-Rezeptor-vermittelten Kalzium Influx**

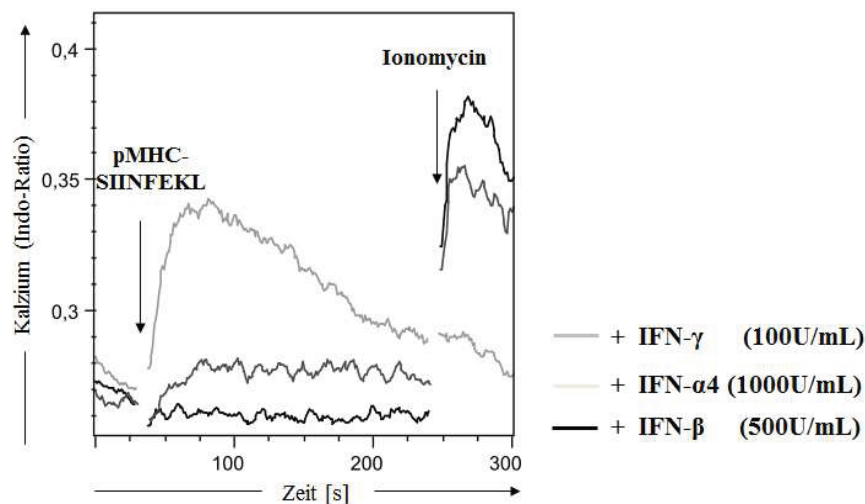
$2 \times 10^6$  aufgereinigte OT-I  $\text{CD8}^+$  T-Zellen wurden mit Indo-1 gefärbt und für eine Stunde mit 50 bzw. 25U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen. Die Mobilisierung von Kalzium-Ionen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Nach 20 Sekunden wurden SIINFEKL-Streptamere zu den Zellen gegeben und der TZR-vermittelte Kalzium-Influx gemessen. Zum Ende der Messung wurde Ionomycin zu den Zellen gegeben, um den maximalen Influx von Kalzium-Ionen zu erzielen. Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

### 3.7.1.5 Inhibition des TZR-vermittelten $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegs erfolgt spezifisch über den IFNAR

Die verschiedenen IFN-Typen binden an unterschiedliche Rezeptoren. Es sollte untersucht werden, ob der inhibitorische Effekt spezifisch für IFN- $\beta$  ist, oder ob andere Typ I IFN-Subtypen oder andere IFN-Typen den TZR-vermittelten Kalzium-Signalweg inhibieren können. Dazu wurden OT-I T-Zellen mit Indo-1 gefärbt und für eine Stunde mit 100U/mL

IFN- $\gamma$ , 1000U/mL IFN- $\alpha$ 4 oder 500U/mL IFN- $\beta$  inkubiert. Nach Zugabe von SIINFEKL-Streptameren wurde der TZR-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx mittels FACS-Analyse untersucht.

Die Stimulation der T-Zellen mit IFN- $\beta$  führte zur Inhibition des TZR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx. Auch die Stimulation mit IFN- $\alpha$ 4 inhibierte die Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Im Gegensatz dazu hatte die Behandlung mit IFN- $\gamma$  keinen Einfluss auf den Influx von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Abbildung 25). Diese Beobachtungen zeigen, dass die Inhibition des Kalzium-Signalweges spezifisch durch Stimulation mit Typ I, aber nicht durch Typ II IFN vermittelt wird.



#### Abbildung 25 Typ I IFN, aber nicht Typ II IFN führt zu verminderter Kalzium-Mobilisierung

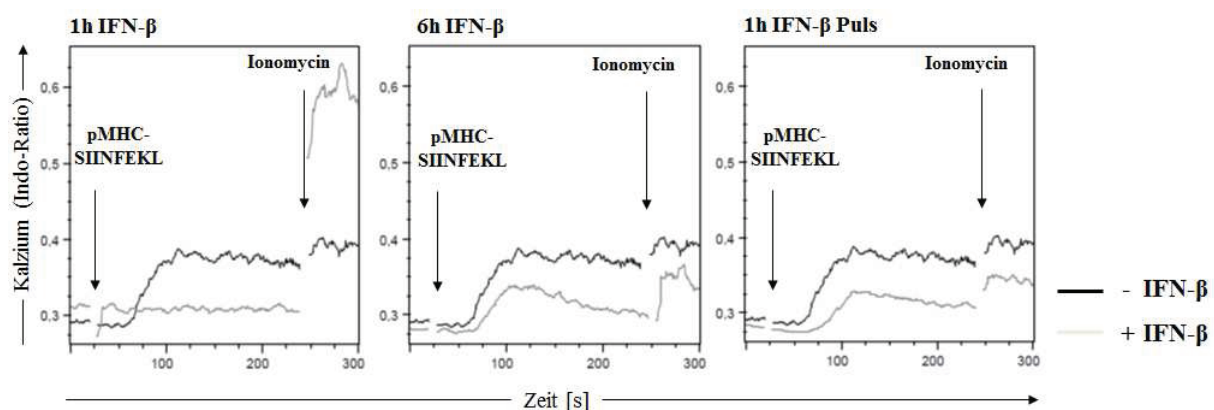
$2 \times 10^6$  aufgereinigte OT-I  $\text{CD8}^+$  T-Zellen wurden mit Indo-1 gefärbt und für eine Stunde mit 100U/mL IFN- $\gamma$ , 1000U/mL IFN- $\alpha$ 4 oder 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen. Die Mobilisierung von Kalzium-Ionen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Nach 20 Sekunden Messung wurden SIINFEKL-Streptamere zu den Zellen gegeben und der TZR-vermittelte Kalzium-Influx gemessen. Zum Ende der Messung wurde Ionomycin zu den Zellen gegeben, um den maximalen Influx von Kalzium-Ionen zu erzielen. Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

#### 3.7.1.6 Zeitpunkt und Dauer einer IFN-Stimulation sind entscheidend für den Effekt auf den TZR-vermittelten $\text{Ca}^{2+}$ -Influx

Die Untersuchung der Proliferation hat gezeigt, dass die Effekte einer IFN-Stimulation auf T-Zellen abhängig vom Zeitpunkt des IFN-Stimulus sind. Während die Stimulation mit 500U/mL IFN- $\beta$  eine Stunde vor der TZR-Stimulation die Proliferation von T-Zellen deutlich

inhibierte, hatte eine sechsstündige IFN-Stimulation eine weniger verminderte Proliferation zur Folge (*Abbildung 9*). Es sollte untersucht werden, ob die Wirkung von IFN auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg abhängig von der Dauer und dem Zeitpunkt einer IFN-Stimulation ist.

OT-I T-Zellen wurden mit Indo-1 gefärbt und für eine oder sechs Stunden mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert. Außerdem wurden T-Zellen für eine Stunde mit IFN stimuliert, gewaschen, für fünf Stunden unbehandelt belassen und anschließend mit SIINFEKL-Streptameren stimuliert.



**Abbildung 26 Unterschiedliche Dauer von IFN-Stimulationen hat verschiedene Effekte auf den T-Zell-Rezeptor-vermittelten Kalzium-Influx**

$2 \times 10^6$  aufgereinigte OT-I  $\text{CD8}^+$  T-Zellen wurden mit Indo-1 gefärbt und für eine (1h IFN- $\beta$ ) bzw. sechs Stunden (6h IFN- $\beta$ ) mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen. Zusätzlich wurden Zellen für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert, das IFN gewaschen und die Zellen für 5 Stunden unstimuliert belassen (1h IFN- $\beta$  Puls). Die Mobilisierung von Kalzium-Ionen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Nach 20 Sekunden wurden SIINFEKL-Streptamere zu den Zellen gegeben und der TZR-vermittelte Kalzium-Influx gemessen. Zum Ende der Messung wurde Ionomycin zu den Zellen gegeben, um den maximalen Influx von Kalzium-Ionen zu erzielen.

Die Stimulation mit SIINFEKL-Streptameren führte zum TZR-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx. Während eine einstündige Stimulation mit IFN- $\beta$  den TZR-vermittelten Kalzium-Influx inhibierte, führte eine sechsstündige IFN-Stimulation nur zu einer leicht verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung (*Abbildung 26, 1h IFN- $\beta$  und 6h IFN- $\beta$* ). Auch eine kurzzeitige IFN-Stimulation, nach der die Zellen anschließend für fünf Stunden unbehandelt belassen wurden, führte zu einem leicht verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx (*Abbildung 26, 1h IFN- $\beta$  Puls*). Diese Daten weisen darauf hin, dass sowohl die Dauer als auch der Zeitpunkt einer IFN-Stimulation

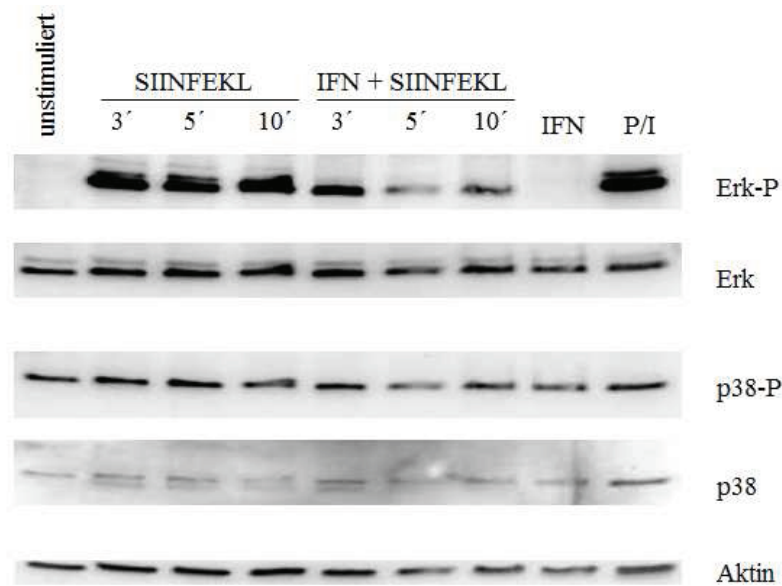
entscheidend für den Effekt auf eine T-Zell-Stimulation sind. Es könnte darauf hinweisen, dass eine IFN-Stimulation zu einer transienten Aktivierung regulatorischer Moleküle führt, die inhibitorisch auf den TZR-Signalweg wirken.

### **3.7.2 Typ I IFN beeinflusst TZR-induzierte Signalmoleküle**

Die Stimulation von Rezeptoren führt zur Induktion verschiedener Signalkaskaden. Der TZR-Signalweg führt neben dem Kalzium-Signalweg zur Aktivierung der MAP-Kinasen Erk, JNK und p38 sowie zur Aktivierung von NFκB. Typ I IFN führt hauptsächlich über die Induktion des Jak/STAT-Signalweges zur Aktivierung von STAT1 und STAT2-Molekülen. Bestimmte Signalmoleküle, wie beispielsweise Zap70, p38, JNK und NFκB können jedoch auch durch eine IFN-Stimulation aktiviert werden. Es sollte deshalb überprüft werden, ob sich IFN- und TZR-induzierte Signalwege gegenseitig beeinflussen und ein so genannter „Crosstalk“ existiert.

OT-I T-Zellen wurden für eine Stunde mit 500U/mL IFN-β stimuliert oder unbehandelt belassen und anschließend mit SIINFEKL-Streptameren für drei, fünf und zehn Minuten stimuliert. Die Aktivierung von Erk, p38, JNK sowie IκB wurde mittels Western Blot-Analyse überprüft. Die Stimulation mit PMA/Ionomycin (P/I) wurde als Kontrolle für die Stimulation des TZR-Signalweges verwendet. Die Stimulation mit SIINFEKL-Streptameren für drei, fünf und zehn Minuten führte zu einer Aktivierung von Erk. Eine alleinige Stimulation mit IFN hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Erk, während eine Vorstimulation mit IFN zu einer deutlich verminderten Phosphorylierung von Erk zu allen untersuchten Zeitpunkten führte.

Eine Phosphorylierung von p38 konnte in allen Ansätzen beobachtet werden, wobei weder eine TZR- noch eine IFN-Stimulation einen Einfluss auf die Phosphorylierung von p38 hatte (*Abbildung 27*).

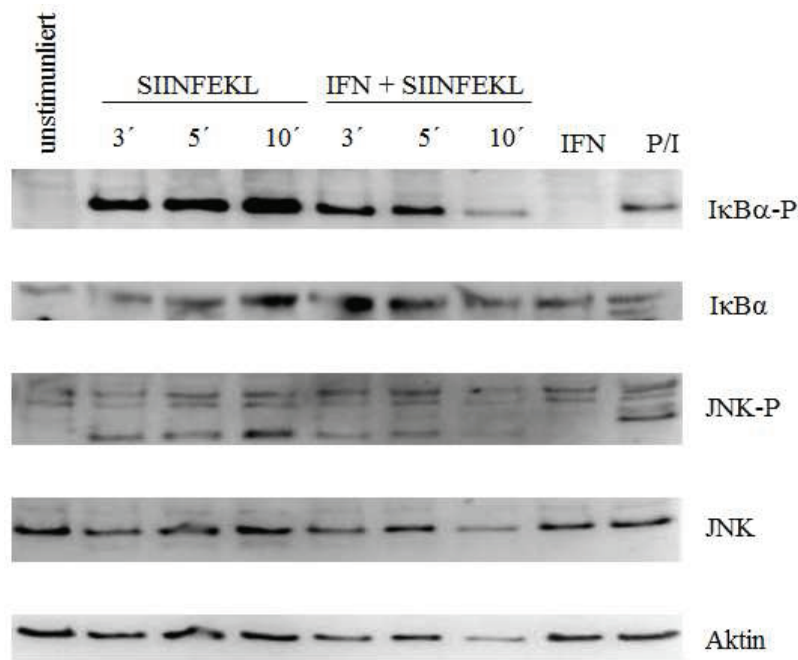


**Abbildung 27 Einfluss von Typ I IFN auf die Phosphorylierung von Erk und p38**

Western Blot Analyse von p-Erk, Erk, p-p38 und p-38.  $2 \times 10^6$  aufgereinigte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen. Die anschließende Stimulation der T-Zellen mit SIINFEKL-Streptameren erfolgte für 3, 5 und 10 Minuten. Als Kontrollen wurden zusätzlich unstimulierte T-Zellen, für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimulierte T-Zellen (IFN) und für 10 Minuten mit PMA/Ionomycin (P/I) stimulierte T-Zellen verwendet. Nach SDS-PAGE wurde die Phosphorylierung der Proteine mit entsprechenden Antikörpern analysiert. Die Membran wurde gestrippt und als Kontrolle erneut mit einem Anti-Aktin Antikörper gefärbt. Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Die Phosphorylierung von I $\kappa$ B führt zur Degradation und somit zur Freisetzung und Aktivierung von NF- $\kappa$ B. In unstimulierten und IFN-stimulierten T-Zellen konnte keine Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  nachgewiesen werden. Die alleinige TZR-Stimulation führte zu einer starken Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$ , während eine Vorstimulation mit IFN- $\beta$  die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  verminderte. Die Phosphorylierung von JNK war nach zehnminütiger Stimulation mit SIINFEKL-Streptameren am stärksten. Der Abgleich mit Aktin zeigte, dass eine IFN-Vorstimulation keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von JNK hatte (*Abbildung 28*).





**Abbildung 28 Einfluss von Typ I IFN auf die Phosphorylierung von IκBα und JNK**

Western Blot Analyse von IκBα, JNK und p-JNK.  $2 \times 10^6$  aufgereinigte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden für eine Stunde mit 500U/mL IFN-β stimuliert oder unbehandelt belassen. Die anschließende Stimulation der T-Zellen mit SIINFEKL-Streptameren erfolgte für 3, 5 und 10 Minuten. Als Kontrollen wurden zusätzlich unstimulierte T-Zellen, für eine Stunde mit 500U/mL IFN-β stimulierte T-Zellen (IFN) und für 10 Minuten mit PMA/Ionomycin (P/I) stimulierte T-Zellen verwendet. Nach SDS-PAGE wurde die Phosphorylierung der Proteine mit entsprechenden Antikörpern analysiert. Die Membran wurde gestriipt und als Kontrolle erneut mit einem Anti-Aktin Antikörper gefärbt. Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Die Stimulation mit IFN-β beeinflusst verschiedene TZR-vermittelte Signalwege. Neben der Inhibition des Ca<sup>2+</sup>-Signalweges führt eine IFN-Vorstimulation zu einer verminderten Aktivierung des Ras/MAPK-Signalweges und von NFκB. Die Phosphorylierung von JNK sowie p38 wurde durch eine IFN-Stimulation jedoch nicht beeinflusst. Während der Ras/MAPK-Signalweg sowie die Aktivierung von NF-κB zumindest teilweise von Ca<sup>2+</sup>-Signalen abhängig sind, ist die Aktivierung von JNK und p38 weitgehend Kalzium-unabhängig. Daher scheint eine IFN-Stimulation über die Hemmung des Ca<sup>2+</sup>-Signalweges, inhibitorisch auf weitere TZR-induzierte Kaskaden zu wirken.

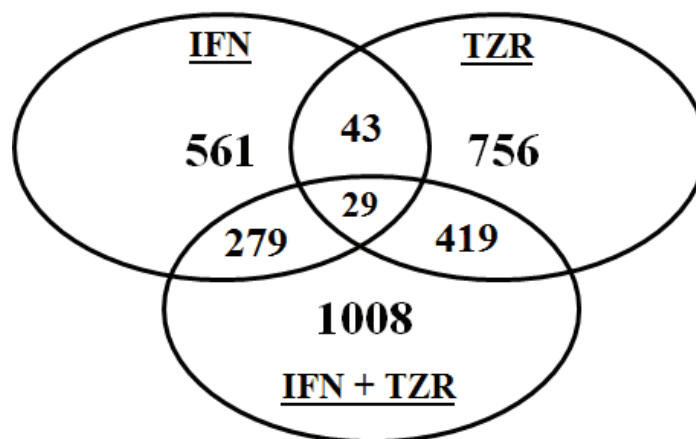


### 3.8 Veränderte Geninduktion nach IFN- und TZR-Stimulation

Die Stimulation des TZR induziert Signalwege, die zur Aktivierung und Kerntranslokation der Transkriptionsfaktoren AP-1, NFAT und NF- $\kappa$ B führen. Diese induzieren eine Vielzahl verschiedener Gene, die Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktionen regulieren. Eine IFN-Vorstimulation inhibiert den TZR-induzierten Kalzium-Signalweg (*Kapitel 3.6*), die Aktivierung des Ras/MAPK-Signalweges und NF $\kappa$ B (*Kapitel 3.7*) und führt zur Inhibition von Proliferation und Effektorfunktionen. Dies lässt auf einen „Crosstalk“ zwischen IFN- und TZR-induzierten Signalwegen schließen.

Aus diesem Grund sollte die Konsequenz dieses „Crosstalks“ zwischen TZR-induzierten und IFN-induzierten Signalwegen auf Ebene der Geninduktion näher untersucht werden. OT-I T-Zellen wurden für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die Stimulation des TZR erfolgte anschließend über SIINFEKL-Streptamere. Eine Stunde nach TZR-Stimulation wurde die mRNA aus unstimulierten, nur IFN-stimulierten, nur TZR-stimulierten sowie IFN- und TZR-stimulierten T-Zellen isoliert und die Induktion verschiedener Gene mittels Microarray-Analyse überprüft. Die Analyse umfasste über 20.000 Gene. Zur weiteren Untersuchung wurden ausschließlich annotierte Gene genutzt, die eine Signalstärke von mindestens 100 aufwiesen. Anschließend wurden Gene ausgewählt, die im Vergleich zu unstimulierten Zellen eine 2,5-fache oder höhere Regulation aufwiesen. Auf diese Weise wurden 2325 Gene identifiziert, die durch mindestens eine Stimulationsbedingung induziert wurden. Die alleinige Stimulation mit IFN führte zur Induktion von 561 Genen. Die alleinige TZR-Stimulation führte zur Induktion von 756 Genen, während die Vorstimulation mit IFN und anschließende TZR-Stimulation 1008 Gene im Vergleich zu unstimulierten Zellen induzierte (*Abbildung 29*). 43 Gene innerhalb dieser Analyse wurden sowohl durch eine TZR- als auch durch eine IFN-Stimulation induziert. Zu diesen Genen gehörte CD69, dessen Expression nach IFN-Stimulation bereits gezeigt wurde

(Abbildung 16). Auch die Gene für Gadd45 $\gamma$ , dessen Genprodukt eine wichtige Rolle beim Zellzyklus sowie programmierten Zelltod spielt, und SOCS1, das über negative Feedback-Mechanismen Signalwege inhibiert, gehörten zu dieser Gruppe. Der genaue Ablauf einer TZR-Stimulation ist entscheidend für die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen. Typ I IFN kann daher möglicherweise Gene induzieren, die normalerweise erst nach einer TZR-Stimulation induziert werden, und somit den genauen Ablauf einer T-Zell-Stimulation verhindern bzw. stören. 419 TZR-induzierte Gene wurden auch bei einer IFN-Vorstimulation und anschließender TZR-Stimulation induziert. Dies lässt vermuten, dass viele TZR-induzierte Gene durch eine IFN-Vorstimulation inhibiert bzw. nicht induziert werden. Des Weiteren wurden 279 Gene sowohl nach alleiniger IFN-Stimulation als auch nach IFN- und TZR-Stimulation induziert. Dies lässt darauf schließen, dass auch IFN-stimulierte Gene durch eine TZR-Stimulation inhibiert werden. Nur 29 Gene wurden durch alle drei Stimulationsbedingungen induziert.

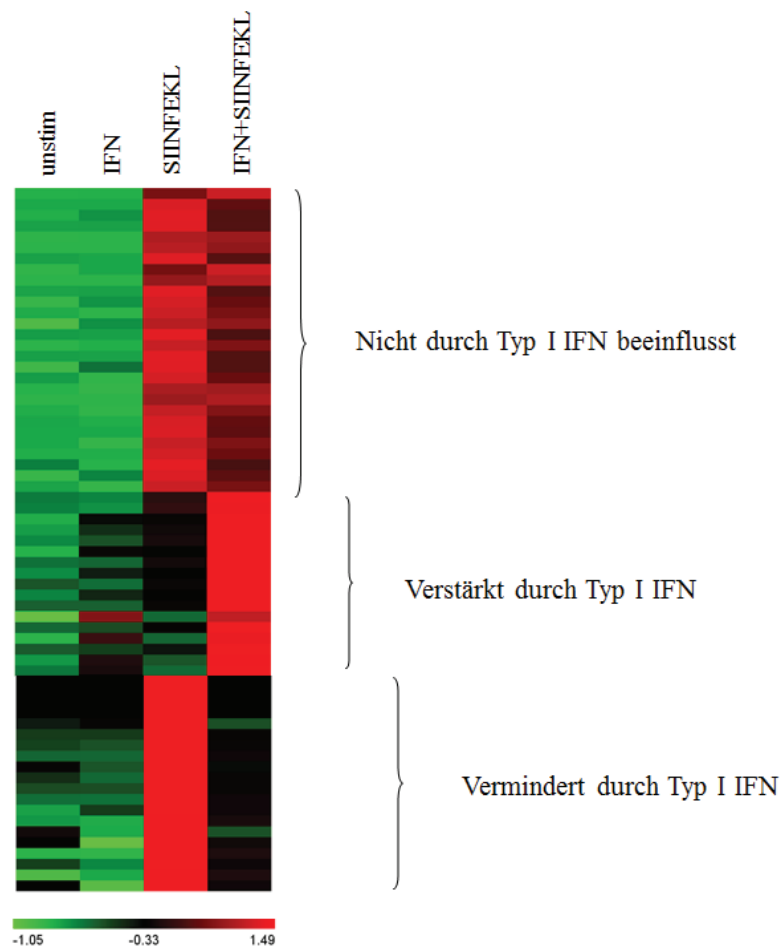


**Abbildung 29 Anzahl induzierter Gene nach IFN-, TZR- oder IFN-und TZR-Stimulation**

2 x 10<sup>6</sup> aufgereinigte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend erfolgte die Stimulation des TZR mit SIINFEKL-Streptameren. Eine Stunde nach TZR-Stimulation wurde die RNA aus unstimulierten, IFN-stimulierten, TZR-stimulierten und IFN-und TZR-stimulierten T-Zellen isoliert und mittels Microarray-Analyse untersucht. Ausgewählt wurden Gene mit einer Signalstärke über 100 und 2,5facher Induktion im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Abbildung zeigt die Anzahl induzierter Gene nach IFN-, TZR- und IFN-und TZR-Stimulation.

### 3.8.1 Einfluss von Typ I IFN auf TZR-induzierte Gene

Typ I IFN führten zur Inhibition bestimmter Signalwege, sodass untersucht werden sollte, welchen Einfluss eine IFN-Stimulation auf TZR-induzierte Gene hat. Die Analyse zeigte, dass Typ I IFN die Induktion TZR-stimulierter Gene unterschiedlich beeinflusst. Neben TZR-induzierten Genen, die durch eine IFN-Vorstimulation nicht beeinflusst wurden, wurde die Induktion bestimmter Gene durch die IFN-Behandlung verstärkt oder vermindert (*Abbildung 30*).



**Abbildung 30 Typ I IFN beeinflusst TZR-stimulierte Gene**

OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden wie bereits beschrieben stimuliert und die induzierten Gene entsprechend der Angaben analysiert (Abb. 29). Von 756 TZR-induzierten Genen wurden 485 durch eine IFN-Vorstimulation nicht beeinflusst, 17 verstärkt und 254 Gene vermindert. Abbildung zeigt normalisierte Heat-Map einer Auswahl der Gene.

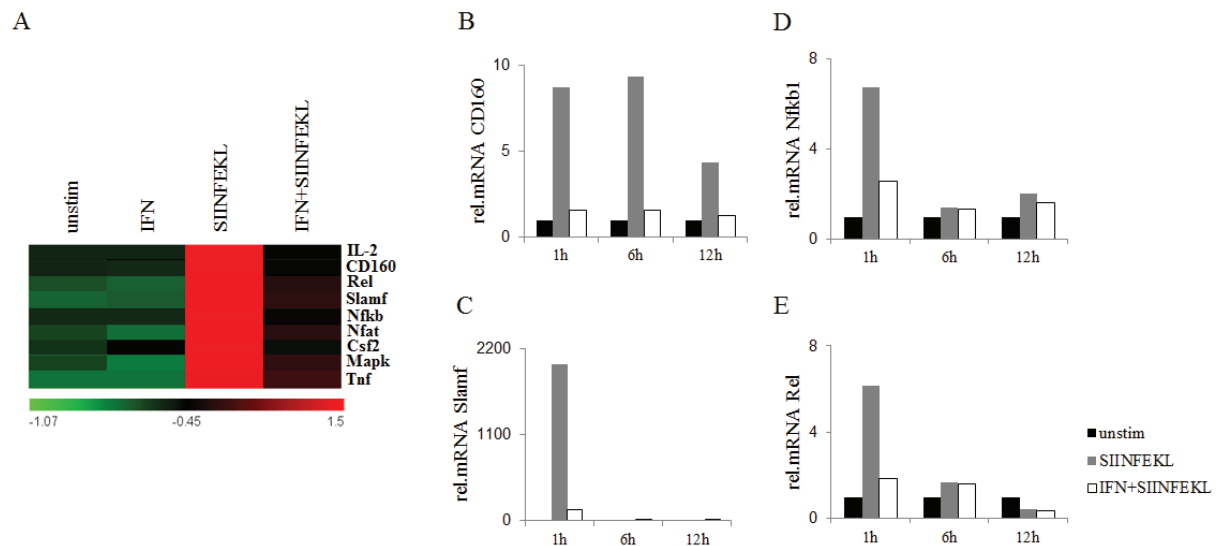
485 Gene, die durch eine TZR-Stimulation induziert wurden, wurden durch eine IFN-Vorstimulation nicht beeinflusst. 17 TZR-induzierte Gene wurden durch eine IFN- und TZR-Stimulation noch verstärkt induziert, während 254 Gene durch die IFN-Vorstimulation nicht bzw. nur vermindert induziert wurden. Die Gene, die durch eine IFN-Stimulation nicht beeinflusst wurden, haben wahrscheinlich keinen Einfluss auf die IFN-vermittelten Effekte, während Gene, die durch eine IFN-Stimulation unterschiedlich reguliert wurden, eine Rolle spielen könnten. Diese Gene wurden daher näher analysiert.

### 3.8.1.1 Typ I IFN inhibieren TZR-induzierte Gene

Die Gen-Analyse zeigte, dass 254 TZR-induzierte Gene durch eine IFN-Vorstimulation nicht oder geringer induziert wurden (*Abbildung 31 A*). Eines dieser Gene ist das IL-2 Gen, bei dem bereits eine verminderte mRNA-Induktion und Expression nach einer IFN-Vorstimulation gezeigt werden konnte (*Abbildung 19*). Diese Analyse bestätigt, dass eine IFN-Vorstimulation die Induktion bestimmter TZR-induzierter Gene inhibiert. Zur weiteren Validierung dieser Ergebnisse wurden RealTime-PCR Analysen ausgewählter Gene für CD160, Slamf sowie NFκB1 und Rel durchgeführt. CD160 ist ein Rezeptor, der multifunktionelle Rollen in T-Zellen spielt. Über Interaktionen mit der CD3ζ-Kette des TZR werden Proliferation und Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen verbessert<sup>90,91</sup>. Die SLAMF (signaling lymphocytic activation molecule family)-Proteine sind Rezeptoren, die zur Aktivierung von NFκB führen können und daher die Entwicklung und Funktionen von T-Zellen regulieren und deren lytische Aktivität und Zytokinproduktion modulieren können<sup>92</sup>. NFκB kann als homo- oder heterodimerer Komplex aus den Proteinen RelA/p65, RelB, NFκB1/p105, NFκB1/p50, Rel und NFκB2/p52 bestehen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Typ I IFN zu einer verminderten Aktivierung von NFκB führt, jedoch auch die Regulation der Expression dieses Transkriptionsfaktors ist für

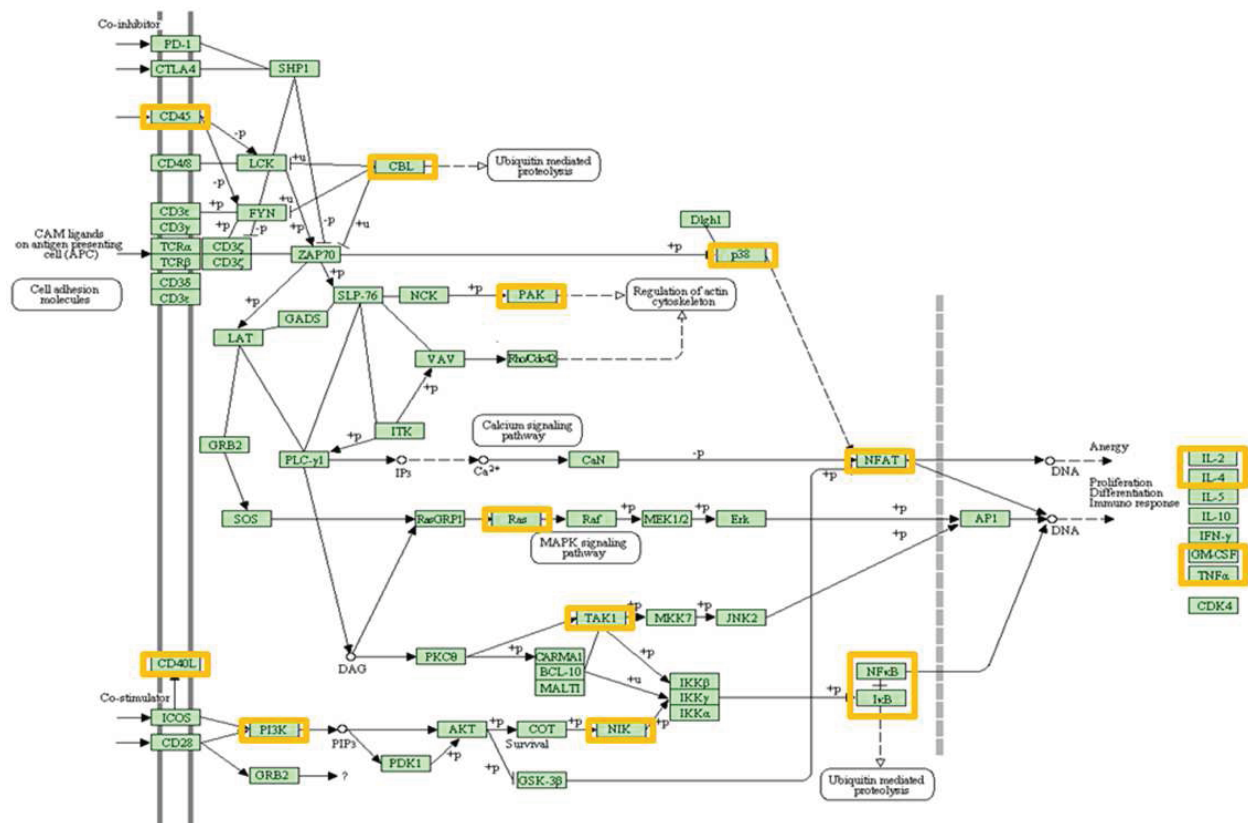
die IFN-vermittelten Effekte relevant. Aufgereinigte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen und mit SIINFEKL-Streptameren inkubiert. Eine, sechs und zwölf Stunden nach TZR-Stimulation wurde mittels quantitativer RealTime-PCR die mRNA-Induktion von CD160, Slamf, Nfkb1 und Rel bestimmt. Die Werte von unstimulierten Zellen wurden gleich 1 gesetzt. Eine TZR-Stimulation führte nach einer bzw. sechs Stunden zu einer ungefähr zehnfachen Induktion von CD160, wobei nach zwölf Stunden noch eine fünffache Induktion vorhanden war. Eine IFN-Vorstimulation führte hingegen zu einer stark verminderten Induktion von CD160 (*Abbildung 31 B*). Eine Stunde nach TZR-Stimulation war die mRNA-Induktion von Slamf1 mehr als 2000-fach erhöht, während eine IFN-Stimulation zu einer ca. 140-fachen Induktion geführt hatte. Nach sechs bzw. zwölf Stunden war die mRNA-Induktion in beiden Fällen wieder stark vermindert, jedoch im Falle einer alleinigen TZR-Stimulation höher als nach einer IFN-Vorstimulation (*Abbildung 31 C*). Die Analyse der mRNA-Induktion von Nfkb1 (*Abbildung 31 D*) und Rel (*Abbildung 31 E*) zeigte, dass nach einstündiger TZR-Stimulation ebenfalls eine verstärkte Induktion im Vergleich zur IFN-Vorstimulation vorhanden war. Diese Unterschiede waren jedoch nach sechs und zwölf Stunden nicht mehr vorhanden. Dies lässt vermuten, dass die Induktion einiger TZR-stimulierter Gene längerfristig durch Typ I IFN inhibiert wird, während bei anderen Genen nur eine kurzzeitige Inhibition vorliegt.



### Abbildung 31 Typ I IFN inhibiert Geninduktion TZR-stimulierter Gene

A OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden wie bereits beschrieben stimuliert und die induzierten Gene entsprechend der Angaben analysiert (Abb. 29). Normalisierte Heat-Map von ausgewählten Genen, die > 2,5-fach durch eine TZR-Stimulation induziert und durch eine IFN-Vorstimulation inhibiert wurden. B, C, D Quantitative RealTime-PCR-Analyse der mRNA Induktion von CD160, Slamf, Nfkb1, Rel. 2 x 10<sup>6</sup> aufgereinigte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen und anschließend mit SIINFEKL-Streptameren stimuliert. Eine, sechs und zwölf Stunden nach TZR-Stimulation wurde die mRNA Induktion überprüft

Die funktionelle Klassifizierung der nach einer IFN-Vorstimulation vermindert induzierten Gene zeigte, dass diese in einer Vielzahl verschiedener Signalwege involviert sind. 29 Gene spielen eine Rolle im MAPK-Signalweg, 16 im T-Zell-Rezeptor-Signalweg (*Abbildung 32*), 15 im Jak/STAT-Signalweg und zwölf in Apoptose-Signalwegen. Typ I IFN inhibiert daher Gene, deren Genprodukte eine wichtige Rolle in den unterschiedlichen Signalkaskaden des TZR-Signalweges spielen. Typ I IFN scheint daher global einen Effekt auf die Genprodukte des TZR-Signalweges zu haben und nimmt somit möglicherweise zusätzlich einen Einfluss auf spätere Stimulationen.



**Abbildung 32 Typ I IFN inhibiert Gene des TZR-Signalweges**

OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden wie bereits beschrieben stimuliert und die induzierten Gene entsprechend der Angaben analysiert (Abb. 29). Abbildung zeigt funktionelle Klassifizierung mittels DAVID-Programm, dargestellt ist TZR-Signalweg.

### 3.8.2 Typ I IFN induziert keine Toleranz-Mechanismen

T-Zell-Antworten müssen strikt reguliert werden, um z.B. Infektionen zu bekämpfen oder körpereigene Schäden durch T-Zellen zu vermeiden. Abhängig von der Stimulation von T-Zellen werden entweder Expansions- und Effektorfunktionen oder Toleranz-Mechanismen induziert. Anergie und Exhaustion sind unabhängige Toleranz-Mechanismen, bei denen T-Zellen funktionell inaktiviert sind. Anergie kann im Fall einer unvollständigen Antigenstimulation oder fehlender Co-Stimulation auftreten. Anergische Zellen überleben, können jedoch auf weitere Stimulationen nicht reagieren, proliferieren oder Effektorfunktionen ausüben<sup>39</sup>. T-Zellen, die den Exhaustion-Phänotyp aufweisen, sind durch

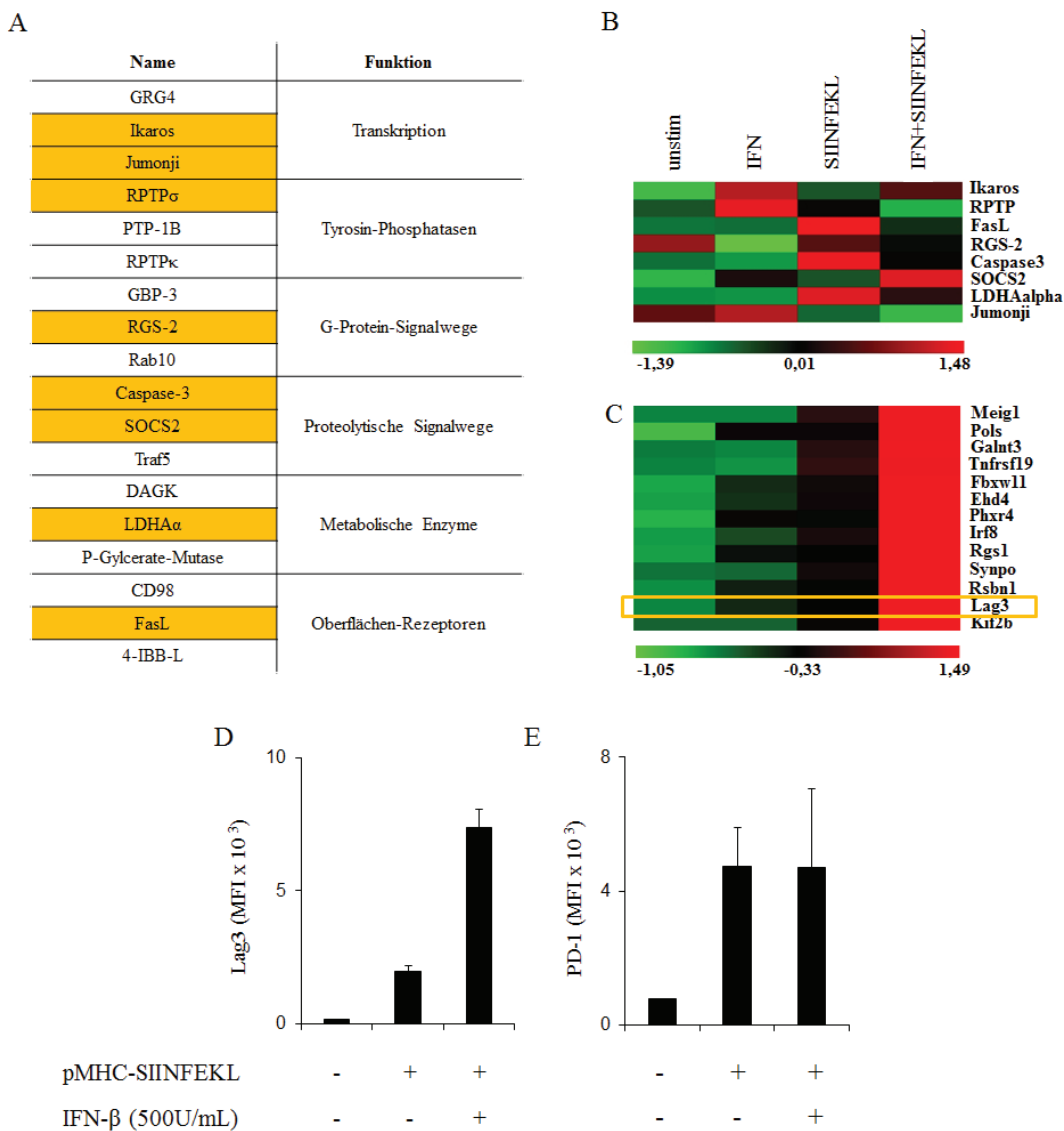
die Expression inhibitorischer Rezeptoren, wie PD-1 und Lag3, gekennzeichnet und weisen ein vermindertes Potential zur Proliferation und Zytokinexpression auf. Eine IFN-Stimulation führte zu einer verminderten Effektorfunktion von T Zellen. Es sollte untersucht werden, ob Markergene für Toleranzmechanismen durch IFN reguliert werden.

Die Stimulation mit Ionomycin kann Anergie in T-Zellen induzieren<sup>93</sup>. Über Genexpressionsanalysen wurden 18 Anergie-Marker identifiziert, deren Induktion nach Ionomycin-Behandlung reproduzierbar war und deren Genprodukte nach verschiedenen Funktionen gegliedert wurden<sup>94</sup> (*Abbildung 33 A*). Von den 18 definierten Anergie-Markern, waren acht Anergie-Marker auch im verwendeten Microarray vorhanden. Die Analyse dieser Anergie-Marker zeigte, dass eine alleinige IFN-Stimulation zur Induktion von Ikaros, RPTP, SOCS2 und Jumonji führte. Die Stimulation des TZR induzierte FasL, RGS-2, Caspase-3 und LDHA $\alpha$ , während die Vorstimulation mit IFN zu einer verminderten Induktion dieser TZR-stimulierten Anergimarker führte (*Abbildung 33 B*). Die untersuchten Anergimarker zeigten keine einheitliche Induktion nach einer IFN-Vorstimulation. Dies lässt vermuten, dass eine IFN-Vorstimulation trotz verminderter Proliferation und Effektorfunktion keine Anergie in T-Zellen induziert.

Zu den 17 TZR-induzierten Genen, die durch eine IFN-Vorstimulation noch verstärkt induziert wurden, gehörte der negative regulatorische Rezeptor Lag3 (*Abbildung 33 C*). Neben Lag3 charakterisieren noch weitere Marker, wie z.B. PD-1 den Exhaustion-Phänotyp. Typ I IFN kann die Expression von PD-1 induzieren, um die Dauer einer T-Zell-Antwort nach Infektionen zu regulieren<sup>95</sup>. Um zu überprüfen, ob eine IFN-Stimulation die Expression der Exhaustion-Marker Lag3 und PD-1 verstärkt, wurden OT-I T-Zellen für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend erfolgte die Stimulation des TZR mit SIINFEKL-Streptameren. Nach 72 Stunden wurde die Expression von Lag3 und PD-1 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es zeigte sich, dass IFN-vorstimulierte T-Zellen im Vergleich zu TZR-stimulierten Zellen eine stärkere Expression von Lag3 aufwiesen



(Abbildung 33 D). Die Analyse der Expression von PD-1 zeigte keine Unterschiede zwischen IFN-vorstimulierten und nur TZR-stimulierten T-Zellen (Abbildung 33 E). Dabei ist anzumerken, dass auch eine TZR-Stimulation *in vitro* transient die Expression von PD-1 induziert, Typ I IFN diese jedoch verlängern kann<sup>95</sup>. Zusätzlich ist die alleinige Expression von Lag3 nicht entscheidend für den Exhaustion-Phänotyp<sup>96</sup>. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Typ I IFN nicht zur Exhaustion von T-Zellen führt.



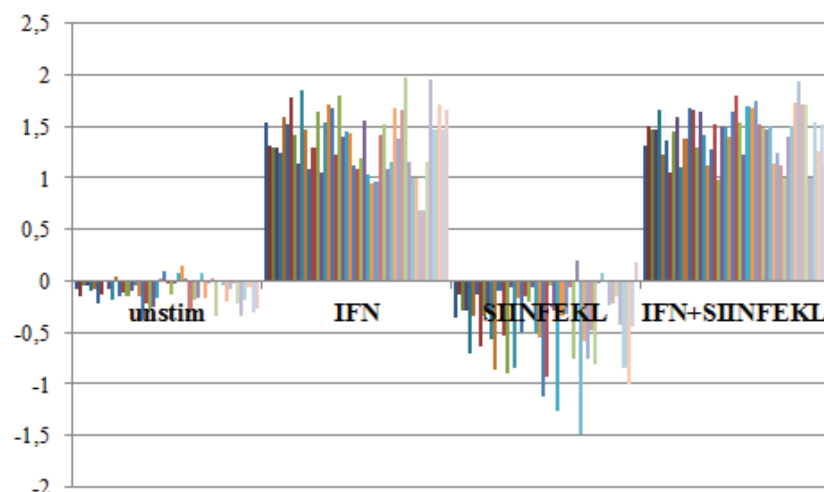
**Abbildung 33 Einfluss von TZR- und IFN-Stimulation auf bestimmte Anergie und Exhaustion-Marker**  
 A Definierte Anergie-Marker und deren funktionelle Gliederung nach Marcià *et al.* 2002. B, C OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden wie bereits beschrieben stimuliert und die induzierten Gene entsprechend der Angaben analysiert (Abb. 29). Normalisierte Heat-Maps von B definierten Anergie-Markern, C Genen, die durch eine IFN-Vorstimulation verstärkt induziert werden. D, E Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Lag3 und PD-1 72 Stunden nach TZR-Stimulation. Daten zeigen MFI  $\pm$  SD.

### 3.8.3 Einfluss einer TZR-Stimulation auf IFN-induzierte Gene

Um einen möglichen Crosstalk zwischen IFN- und TZR-induzierten Genen zu identifizieren, wurden neben dem Einfluss einer IFN-Stimulation auf TZR-induzierte Gene auch der Effekt einer TZR-Stimulation auf IFN-induzierte Gene analysiert. Es zeigte sich, dass 283 der 561 IFN-induzierten Gene durch eine TZR-Stimulation verstärkt bzw. vermindert induziert wurden.

#### 3.8.3.1 IFN-induzierte Gene, die nicht durch eine TZR-Stimulation beeinflusst werden

278 der 561 IFN-induzierten Gene wurden durch eine TZR-Stimulation nicht beeinflusst. Mit Hilfe von biostatistischen Analysen wurden Gene identifiziert, die durch eine IFN-Stimulation induziert wurden und bei denen die IFN-Vorstimulation mit anschließender TZR-Stimulation keinen Einfluss auf die Induktion dieser Gene zeigte (persönliche Mitteilung Razif Gabdouilline, *Abbildung 34*).

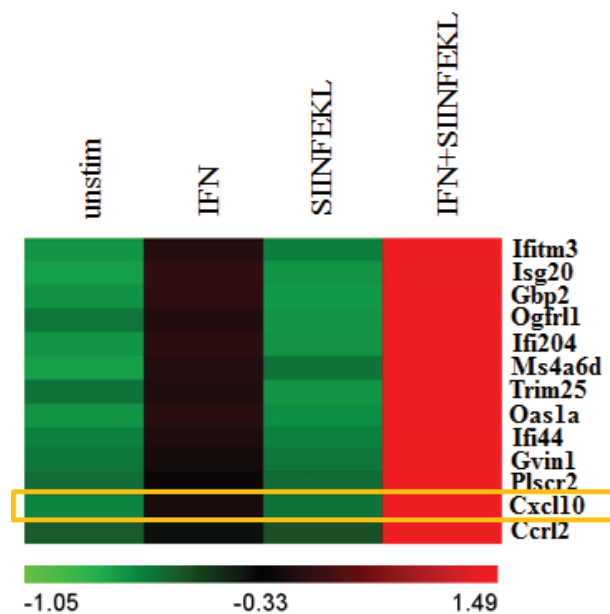


**Abbildung 34 IFN-stimulierte Gene, die durch eine TZR-Stimulation nicht beeinflusst werden**

OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden wie bereits beschrieben stimuliert (Abb. 29). Für die Analyse wurden Top 5000 regulierte Gene mittels CRC-Programm herausgefiltert und 2000 nicht-regulierte Gene als Hintergrund genutzt. 3417 Gene bildeten 21 Cluster mit mehr als 50 Genen. Für jedes Cluster wurde mittels GO Klassifizierung die 50 repräsentativsten Gene, abhängig von der Über-Repräsentation von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, dargestellt. Die Expressionswerte wurde log2 transformiert und zurücktransformiert, um einen 0-Wert zu erhalten. Abbildung zeigt Daten eines Clusters, bei dem eine TZR-Stimulation keinen Einfluss auf IFN-stimulierte Gene hatte.

### 3.8.3.2 IFN-induzierte Gene, deren Expression durch TZR-Stimulation verstärkt werden

Es wurden 52 IFN-stimulierte Gene identifiziert, die durch eine IFN-Vorstimulation und anschließender TZR-Aktivierung noch verstärkt induziert wurden (*Abbildung 35*). Zu diesen Genen gehörte CXCL10, welches als Chemokin zur Rekrutierung von NK-Zellen, B-Zellen, Neutrophilen und T-Zellen zum Infektionsort führt. In anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Typ I IFN dieses Gen in CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzieren kann<sup>62</sup>.



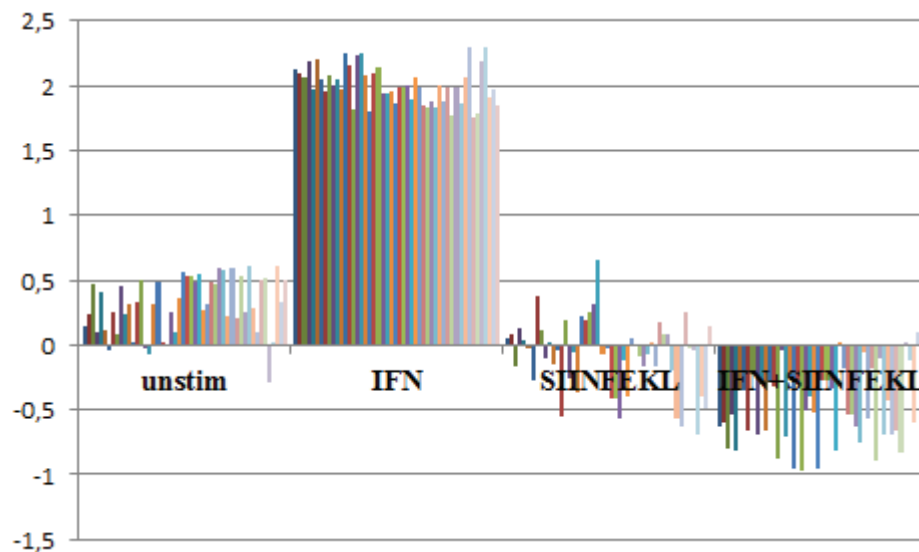
**Abbildung 35 IFN-induzierte Gene, die durch eine TZR-Stimulation stärker induziert werden**

OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden wie bereits beschrieben stimuliert und die induzierten Gene entsprechend der Angaben analysiert (Abb. 30). Normalisierte Heat-Map einer Auswahl von 52 Genen, die durch IFN-Stimulation induziert und durch IFN- und TZR-Stimulation verstärkt induziert wurden.

### 3.8.5 Inhibition der Expression IFN-stimulierter Gene durch TZR-Stimulation

Eine Studie mit humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen hat gezeigt, dass eine IFN-Stimulation nach Aktivierung des TZR nicht zu antiproliferativen Effekten führt. Allerdings wurde eine zehnfach verminderte Induktion von ISGs beobachtet<sup>97</sup>. Es sollte untersucht werden, ob nicht nur eine IFN-Stimulation die TZR-induzierten Signalwege beeinflusst, sondern auch eine TZR-Stimulation die Induktion von IFN-abhängigen ISGs. Die Analysen zeigten, dass 231 IFN-induzierte Gene, durch eine TZR-Stimulation nach IFNAR-Aktivierung

herunterreguliert bzw. nicht induziert wurden (persönliche Mitteilung Razif Gabdouilline, *Abbildung 36*).



**Abbildung 36 Analyse von IFN-stimulierten Genen, die durch TZR-Stimulation runterreguliert wurden**

OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden wie bereits beschrieben stimuliert (Abb. 29). Für die Analyse wurden Top 5000 regulierte Gene mittels CRC-Programm herausgefiltert und 2000 nicht-regulierte Gene als Hintergrund genutzt. 3417 Gene bildeten 21 Cluster mit mehr als 50 Genen. Für jedes Cluster wurde mittels GO Klassifizierung die 50 repräsentativsten Gene, abhängig von der Überrepräsentation von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen dargestellt. Die Expressionswerte wurde log2 transformiert und zurücktransformiert, um einen 0-Wert zu erhalten. Abbildung zeigt Daten eines Clusters, bei dem eine TZR-Stimulation die Induktion IFN-stimulierter Gene inhibiert.

Die Analyse der Microarray-Daten lässt vermuten, dass ein „Crosstalk“ zwischen Typ I IFN- und TZR-induzierten Signalwegen existiert, wobei inhibitorische und stimulatorische Wechselwirkungen identifiziert wurden.

### 3.9 Einfluss von Typ I IFN auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach TZR-Stimulation *in vivo*

Die Vorstimulation mit IFN- $\beta$  führt *in vitro* zu einer Verminderung von Proliferation und Effektorfunktionen. Es sollte daher untersucht werden, welchen Einfluss eine IFN-Stimulation auf die Aktivierung von T-Zellen *in vivo* hat.

Typ I IFN können die Reifung von DCs sowie deren Antigenpräsentation und Expression co-stimulatorischer Moleküle anregen und somit zu einer verbesserten Stimulation von T-Zellen führen<sup>56-60</sup>. Um den Effekt von IFN ausschließlich auf T-Zellen zu untersuchen, wurden CD11c<sup>+</sup> DCs aus IFNAR-defizienten Mäusen isoliert und mit dem SIINFEKL-Peptid beladen. Die beladenen DCs wurden daraufhin i.v. in w.t. Mäuse injiziert. Thy1.1 x OT-I T-Zellen wurden mit CFSE gefärbt, für eine Stunde mit 500U/mL IFN-β stimuliert oder unbehandelt belassen und 24 Stunden nach dem Transfer der DCs i.v. in die w.t. Mäuse injiziert (*Abbildung 37 A*). Der Oberflächenmarker Thy1.1 dient dabei der Unterscheidung zwischen den transferierten Thy1.1<sup>+</sup> OT-I T-Zellen und den Thy1.2<sup>+</sup> T-Zellen der w.t. Mäuse. Es wurden Anzahl, Proliferation, Aktivierungszustand und Effektorfunktion der T Zellen untersucht.

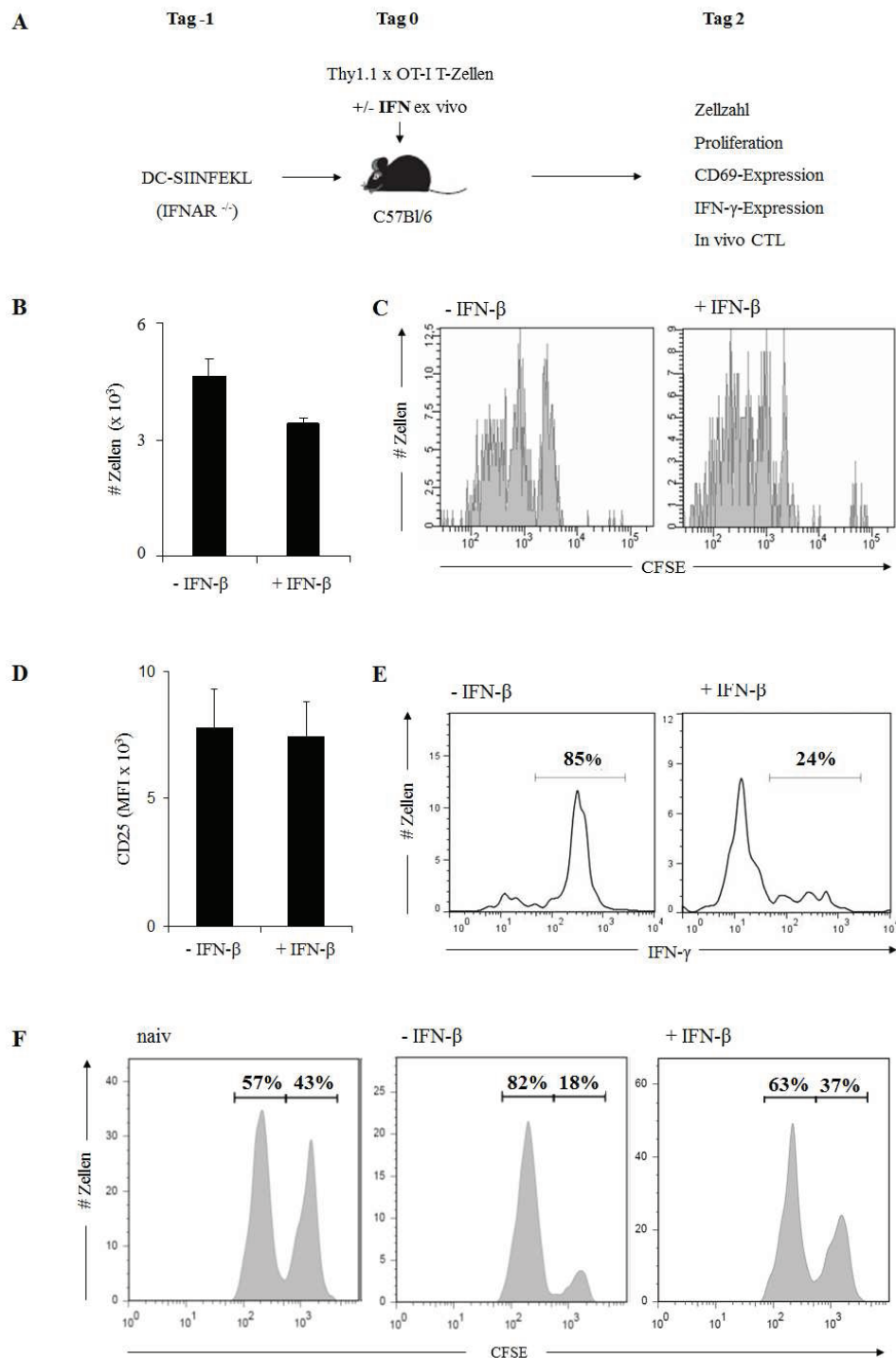
An Tag 2 nach dem T-Zell-Transfer wurden weniger der IFN-stimulierten T-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen in der Milz detektiert (*Abbildung 37 B*). Im Gegensatz dazu wiesen sowohl unbehandelte als auch IFN-behandelte T-Zellen eine vergleichbare Proliferation auf (*Abbildung 37 C*). Diese Daten lassen vermuten, dass T-Zellen mit und ohne IFN-Behandlung im gleichen Ausmaß proliferieren, eine IFN-Vorstimulation jedoch, wie bereits *in vitro* gezeigt (*Abbildung 12*), zu einem verstärkten Zelltod führt. Tote Zellen werden vom Immunsystem eliminiert und können *in vivo* nicht nachgewiesen werden. Die verminderte Anzahl der T-Zellen ist wahrscheinlich auf diese Eliminierung zurückzuführen.

Die Analyse des Aktivierungszustands anhand der Expression von CD25 zeigte, dass alle transferierten Zellen aktiviert wurden. Der Aktivierungsstatus der Zellen wurde durch die IFN-Behandlung nicht beeinflusst (*Abbildung 37 D*) und bestätigt die Daten der *in vitro* Experimente, die gezeigt haben, dass Typ I IFN die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht beeinflusst.

Eine IFN-Vorstimulation führte *in vitro* zu einer verminderten Effektorfunktion der T-Zellen, da diese eine geringere Expression des Effektormoleküle Granzym B und IFN-γ (*Abbildung*

13) und der Todes-Liganden FasL und TRAIL (*Abbildung 14*) aufwiesen. Die Stimulation unbehandelter T-Zellen mit SIINFEKL-beladenen DCs *in vivo* führte zu einer starken Expression von IFN- $\gamma$ , während *ex vivo* IFN-vorstimulierte T-Zellen eine verminderte IFN- $\gamma$ -Expression zeigten (*Abbildung 37 E*).

IFN-stimulierte T-Zellen zeigten *in vitro* ein vermindertes Potential Zielzellen zu töten (*Abbildung 15*). Aus diesem Grund sollte mittels *in vivo* CTL-Assay überprüft werden, ob eine IFN-Stimulation auch nach der TZR-Stimulation *in vivo* einen Einfluss auf das Töten von Zielzellen hat. Dazu wurden Milzzellen mit hohen CFSE Konzentrationen (CFSE<sup>high</sup>) gefärbt, mit dem SIINFEKL-Peptid beladen und 1:1 mit Milzzellen gemischt, die mit niedrigen CFSE Konzentrationen (CFSE<sup>low</sup>) gefärbt und nicht beladen wurden. Die CFSE<sup>high</sup> und CFSE<sup>low</sup>-Zellen wurden i.v. in w.t. Mäuse injiziert, in die ein Tag zuvor IFN-behandelte und unbehandelte OT-I T-Zellen injiziert wurden. Aktivierte Antigen-spezifische T-Zellen erkennen und eliminieren die Peptid-beladenen, CFSE<sup>high</sup>-Zellen, während die CFSE<sup>low</sup>-Zellen ohne Peptid nicht beeinflusst werden. 16 Stunden nach Injektion wurde das Töten der Zielzellen anhand des Verhältnisses von CFSE<sup>high</sup>- und CFSE<sup>low</sup>-Zellen mittels FACS-Analyse überprüft. Die Analyse von Milzen naiver Mäuse, in die keine OT-I T-Zellen injiziert wurden, zeigte den gleichen Anteil von CFSE<sup>high</sup>- und CFSE<sup>low</sup>-Zellen. Im Gegensatz dazu führten unbehandelte T-Zellen zu einem niedrigen Anteil SIINFEKL-Peptid beladener CFSE<sup>high</sup>-Zellen. Die transferierten OT-I T-Zellen konnten somit die Zielzellen, die das entsprechende Antigen präsentierten, eliminieren. IFN-behandelte T-Zellen verminderten ebenfalls den Anteil der CFSE<sup>high</sup>-Zellen, jedoch war hier der Anteil der Zielzellen ungefähr doppelt so hoch wie bei unbehandelten T-Zellen (*Abbildung 37 F*). IFN-behandelte T-Zellen haben somit auch *in vivo* ein vermindertes Potential Zielzellen zu töten. Die Daten zeigen, dass eine IFN-Stimulation einen negativen Effekt auf das Überleben und die Effektorfunktionen von T-Zellen *in vivo* hat.



**Abbildung 37 Typ I IFN führt zu verminderter Aktivierung und Effektorfunktionen von *in vivo* stimulierten T-Zellen**

5 x 10<sup>5</sup> SIINFEKL-Peptid-gepulste CD11c<sup>+</sup> DCs aus IFNAR-defizienten Mäusen wurden i.v. in C57BL/6- Mäuse injiziert. 2 x 10<sup>6</sup> aufgereinigte Thy1.1 x OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit CFSE gefärbt und für eine Stunde mit 500U/mL IFN-β stimuliert oder unbehandelt belassen. 24 Stunden nach Injektion der DCs wurden die T-Zellen ebenfalls i.v. injiziert. 48 Stunden nach T-Zell-Injektion wurden die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten mittels FACS-Analyse untersucht. A Schematische Darstellung des Experiments. B Anzahl Thy1.1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz. C CFSE-Proliferationsassay der injizierten T-Zellen. D CD25-Expression von Thy1.1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Daten zeigen MFI ± SD. E Expression von IFN-γ von Thy1.1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen. F *In vivo* CTL Assay in naiven Mäusen oder Mäusen mit IFN-unbehandelten (-IFN-β) oder behandelten (+IFN-β) T-Zellen. Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

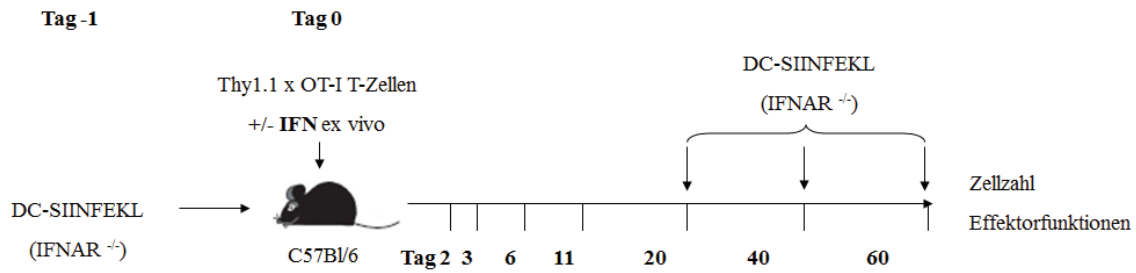
Eine IFN-Vorstimulation vermindert kurzzeitig nach der T-Zell-Aktivierung *in vivo* das Überleben der T-Zellen und führt zu verminderten Effektorfunktionen. Es sollte nun untersucht werden, welche langfristigen Auswirkungen eine einstündige Vorstimulation mit IFN auf T-Zellen *in vivo* ausübt.

Hierzu wurden CD11c<sup>+</sup> DCs aus IFNAR-defizienten Mäusen mit dem SIINFEKL-Peptid beladen und i.v. in w.t. Mäuse injiziert. Nach 24 Stunden wurden Thy1.1 x OT-I T-Zellen für eine Stunde mit 500U/mL IFN-β stimuliert oder unbehandelt belassen und i.v. in die w.t. Mäuse transferiert. Nach zwei, drei, sechs und elf Tagen wurde die Anzahl der T-Zellen in der Milz sowie deren Expression von IFN-γ überprüft. Zusätzlich erfolgte eine Re-Stimulation der T-Zellen am Tag 20, 40 und 60 nach T-Zell-Injektion durch injizierte SIINFEKL-Peptid-beladene CD11c<sup>+</sup> DCs. Zwei Tage nach dieser Stimulation wurden ebenfalls Anzahl sowie IFN-γ-Expression analysiert (*Abbildung 38 A*).

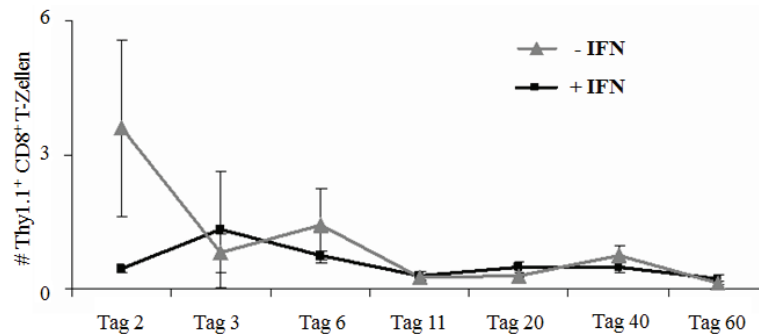
An Tag 3 nach dem Transfer der T-Zellen nimmt die Anzahl unbehandelter T-Zellen ab, während die Anzahl IFN-behandelter T-Zellen im Vergleich zu Tag 2 gleich bleibt. Bereits von Tag 3 an bis zum letzten Tag der Analyse und nach Re-Stimulation mit DCs konnten keinerlei Unterschiede mehr hinsichtlich der Anzahl von IFN-behandelten oder unbehandelten OT-I T-Zellen festgestellt werden (*Abbildung 38 B*). Hinsichtlich der IFN-γ Expression konnten ebenfalls vom dritten Tag nach dem Transfer an keine Unterschiede zwischen IFN-behandelten und unbehandelten T-Zellen beobachtet werden (*Abbildung 38 C*). Eine IFN-Stimulation scheint also nur vorübergehend einen Einfluss auf T-Zellen zu nehmen.



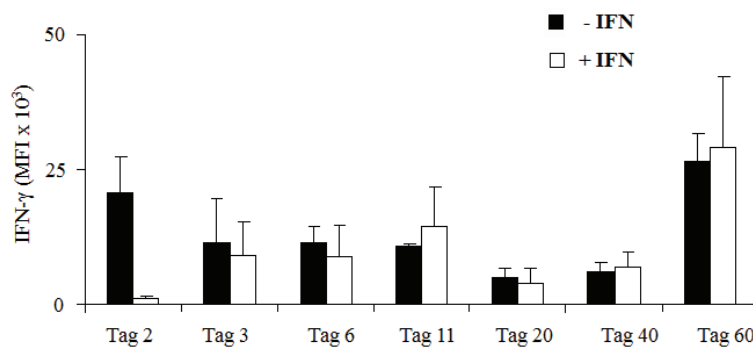
A



B



C



### Abbildung 38 Eine IFN-Stimulation führt nur vorübergehend zu einer verminderten Anzahl und Effektorfunktion von T-Zellen

5 x 10<sup>5</sup> SIINFEKL-Peptid-gepulste CD11c<sup>+</sup> DCs aus IFNAR-defizienten Mäusen wurden i.v. in C57BL/6- Mäuse injiziert. 2 x 10<sup>6</sup> aufgereinigte Thy1.1 x OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit CFSE gefärbt und für eine Stunde mit 500U/mL IFN- $\beta$  stimuliert oder unstimuliert belassen. 24 Stunden nach Injektion der DCs wurden die T-Zellen ebenfalls i.v. injiziert. 2, 3, 6, 11, 20, 40 und 60 Tage nach T-Zell-Injektion wurden die Anzahl von Thy1.1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels FACS-Analyse untersucht. An den Tagen 20, 40 und 60 wurden 2 Tage vor der Analyse zusätzlich erneut SIINFEKL-Peptid-beladene CD11c<sup>+</sup> DCs injiziert. A Schematische Darstellung des Experiments. B Anzahl Thy1.1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz. C IFN- $\gamma$ -Expression von Thy1.1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Daten zeigen MFI.

Typ I IFN kann TZR-Signalwege inhibieren und somit die Geninduktion verändern, wodurch Proliferation und Effektorfunktionen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen negativ beeinflusst werden. Entscheidend für diese Effekte sind der Zeitpunkt sowie die Menge an Typ I IFN. Auch bei

einer T-Zell-Aktivierung *in vivo* kann eine vorherige IFN-Stimulation transient die Anzahl sowie Effektorfunktionen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen herabsetzen.

Unsere Versuche lassen vermuten, dass Typ I IFN T-Zell-Antworten zunächst unterdrückt bzw. inhibiert, um möglicherweise unnötige oder unspezifische Reaktionen zu verhindern.

## 4. Diskussion

Typ I IFN wird nach viralen Infektionen, in Folge von Entzündungen oder bakteriellen Infektionen produziert. Neben der antiviralen Wirkung kann es direkt und indirekt auf Immunzellen wirken und deren Funktion modulieren. In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass Typ I IFN unter bestimmten Bedingungen Immunreaktionen verbessert, jedoch auch vermindern kann. Die bisherigen Untersuchungen lassen auf mögliche Interaktionen zwischen IFN-induzierten Signalwegen und den Signalkaskaden, die durch TZR-Stimulation aktiviert werden, schließen. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen waren jedoch bisher nicht bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher den Einfluss von Typ I IFN auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen, um Aufschluss über einen möglichen Crosstalk zwischen den beiden Signalkaskaden zu erhalten.

### 4.1 Typ I IFN inhibiert die Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Die Antigen-spezifische Stimulation des TZR naiver T-Zellen führt zur Proliferation sowie Expansion der T-Zellen. Typ I IFN kann die Expansion von T-Zellen beeinflussen. Verschiedene Studien zeigen, dass die Anzahl IFNAR<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die nicht auf Typ I IFN reagieren können, nach LCMV-Infektionen deutlich vermindert ist<sup>56, 63-65</sup>. Dabei beeinflussen direkte IFN-Signale nicht die Proliferation der T-Zellen, jedoch deren Überleben<sup>64</sup>. Die beschriebenen Effekte sind nach LCMV-Infektionen vorhanden, spielen jedoch nach Infektionen mit dem Vaccinia Virus oder Listerien nur eine untergeordnete Rolle<sup>65</sup>. In *in vitro*-Studien wurde Typ I IFN als drittes potentiell Signal nach TZR- und Co-Rezeptor-Stimulation identifiziert, das zu einer verbesserten Proliferation führt<sup>27</sup>. Die beschriebenen Effekte von Typ I IFN auf die Proliferation von T-Zellen sind jedoch

widersprüchlich, da andere Studien zeigen, dass Typ I IFN die Proliferation von T-Zellen *in vitro* inhibiert. Viele dieser Studien wurden anhand von transformierten und immortalisierten T-Zell-Linien durchgeführt<sup>75</sup>. Bei primären T-Zellen führen erst sehr hohe Konzentrationen an Typ I IFN zu einer verminderten Proliferation<sup>69</sup>. Primäre T-Zellen, die *in vivo* mit IFN vorstimuliert werden, zeigen hingegen nach einer TZR-Stimulation *in vitro* eine verminderte Proliferation<sup>68</sup>. Zusätzlich konnten in IFNAR<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Vakzinierung verbesserte T-Zell-Antworten festgestellt werden<sup>70</sup>. Des Weiteren ist bekannt, dass Typ I IFN Immunreaktionen unterdrückt und die Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen inhibieren kann<sup>73</sup>.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen führte eine einstündige Vorstimulation mit 500U/mL IFN- $\beta$  zur Inhibition der Proliferation von SIINFEKL-Streptamer-stimulierten OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 6). Eine Inhibition der Proliferation kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen kann es zu einer Beeinflussung des Zellzyklus kommen, bei der Zellen in einer Phase des Zellzyklus stagnieren oder den Zellzyklus langsamer durchlaufen. Zum anderen kann die Zellzahl aufgrund von Zelltod vermindert sein. Hierbei könnten T-Zellen entweder aktiv durch die Induktion von Apoptose sterben oder schlechter überleben.

Typ I IFN kann den Zellzyklus von T-Zellen beeinflussen. So wurde beschrieben, dass Typ I IFN die dsRNA-aktivierte Kinase PKR induziert. Diese kann die Proliferation von T-Zellen entweder direkt über eine generelle Inhibition der Proteinsynthese oder indirekt über die Produktion von IL-4 negativ regulieren<sup>76</sup>. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die IFN-vermittelte Inhibition der Proliferation über STAT1 reguliert wird. Als wichtiges Signalmolekül des IFN-Signalweges wird STAT1 nach Bindung von Typ I IFN an den IFNAR durch Janus-Kinasen phosphoryliert und aktiviert<sup>8</sup>. Es ist bekannt, dass STAT1<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen trotz hoher IFN-Konzentrationen *in vitro* proliferieren. Antigen-spezifische T-Zellen proliferieren nach LCMV-Infektionen, die mit einer starken IFN-Produktion

einhergehen. Im Rahmen dieser Studie wurde in T-Zellen, die nach einer LCMV-Infektion nicht proliferieren, eine im Vergleich zu den proliferierenden T-Zellen deutlich erhöhte Menge an STAT1-Protein nachgewiesen. Antigen-spezifische T-Zellen können somit die IFN-vermittelte Inhibition der Proliferation über die Menge an STAT1-Protein regulieren<sup>69</sup>. STAT1 und die antiproliferativen IFN-Effekte sind daher wichtige Faktoren, um die Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen frühzeitig nach viralen Infektionen zu regulieren. Die Stimulation von naiven OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit IFN- $\beta$  führt zur Phosphorylierung und somit zur Aktivierung von STAT1 (Lucas Kemper, persönliche Mitteilung). Es ist daher möglich, dass die Phosphorylierung von STAT1 für die IFN-vermittelte Inhibition der Proliferation verantwortlich ist. Mit Hilfe von STAT1<sup>-/-</sup> OT-I T-Zellen könnte diese Hypothese überprüft werden.

Die Induktion von Zelltod bzw. Apoptose ist ein weiterer wichtiger Mechanismus um T-Zell-Antworten gezielt zu regulieren. Eine IFN-Vorstimulation führte zu einem signifikanten Anstieg toter CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* und einer verminderten Anzahl *in vivo* (Abbildung 12 und 37 B). Der erhöhte Anteil toter Zellen kann auf eine IFN-vermittelte Induktion von Apoptose zurückzuführen sein. Eine Behandlung mit poly(I:C), die zu einer starken Produktion von Typ I IFN führt, kann zur Aktivierung von Caspase-3 und Caspase-8 in CD8<sup>+</sup> T-Zellen führen. IFNAR<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind hingegen resistent gegenüber dieser polyI:C-induzierten Apoptose<sup>71</sup>. Zusätzlich können IFN-vermittelte inhibitorische Mechanismen zum verstärkten Zelltod führen. Eine Stimulation des TZR führt einerseits zur Produktion von IL-2, welches als extrinsisches Überlebens-Signal wirkt, und andererseits zur Aktivierung von z.B. Bcl-x<sub>L</sub>, welches intrinsisch Apoptose verhindert<sup>99-102</sup>. Typ I IFN könnte daher entweder direkt Apoptose induzieren oder TZR-Signalwege inhibieren, die zum Überleben und zur Proliferation notwendig sind. In unseren Versuchen sind der erhöhte Anteil toter Zellen und die verminderte Proliferation möglicherweise auf die inhibierte Produktion von IL-2

zurückzuführen. Eine Vorbehandlung mit Typ I IFN führte zu einer deutlich verminderten mRNA-Induktion sowie Expression von IL-2 (*Abbildung 19*). IL-2 ist entscheidend für Homeostase und Proliferation von T-Zellen. Die Zugabe von IL-2 zu IFN-stimulierten T-Zellen konnte die inhibierende Wirkung auf die Proliferation aufheben (*Abbildung 20*). Es kann daher vermutet werden, dass die geringere Produktion von IL-2 zu einer verminderten Proliferation führt.

#### 4.2 Der Einfluss von Typ I IFN auf die Aktivierung, Differenzierung und Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen

T-Zellen werden durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs) aktiviert, wodurch sie proliferieren und zu Effektor- und Gedächtniszellen differenzieren. Der Aktivierungszustand von T-Zellen ist durch die Expression von Aktivierungs-Markern gekennzeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Typ I IFN auf die Aktivierung anhand der Expression von CD69, CD62L und CD25 untersucht. CD69 ist einer der ersten Oberflächenmarker, der nach der Aktivierung von T-Zellen exprimiert wird<sup>28</sup>. CD62L ist ein Homing-Rezeptor, der notwendig ist, um aus dem Blutstrom in die Lymphknoten zu migrieren und dort von APCs aktiviert zu werden<sup>29</sup>. CD25 bzw. IL2RA ist die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors und über die Bindung von IL-2 entscheidend für Proliferation und Homeostase von CD8<sup>+</sup> T-Zellen<sup>32</sup>. Eine fehlende oder unvollständige Aktivierung von T-Zellen kann zur Inhibition der Proliferation und Effektorfunktion führen. Typ I IFN kann die Expression von CD69 induzieren und T-Zellen in einen Zustand, der als „partial lymphocyte activation“ bezeichnet wird, versetzen<sup>88</sup>. Eine einstündige IFN-Vorstimulation führte nach der TZR-Stimulation transient zu einer erhöhten Expression von CD69 im Vergleich zu TZR-stimulierten T-Zellen. Bereits drei Stunden nach TZR-Stimulation waren jedoch keine

Unterschiede mehr zwischen IFN-behandelten und -unbehandelten T-Zellen vorhanden (*Abbildung 16*). Typ I IFN kann daher die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 induzieren und somit möglicherweise die Aktivierungsschwelle für eine Antigen-spezifische Stimulation von T-Zellen beeinflussen. Im Gegensatz dazu hatte Typ I IFN sowohl *in vitro* als auch *in vivo* keinen Einfluss auf die Expression der Aktivierungsmarker CD62L und CD25 (*Abbildungen 17 & 37, Daten nicht gezeigt*). Die Daten zeigen, dass T-Zellen trotz IFN-Stimulation vollständig aktiviert werden können. Für die IFN-vermittelte Inhibition von Proliferation und Effektorfunktion muss daher ein anderer Mechanismus zu Grunde liegen.

Nach dem Bekämpfen einer Infektion verbleiben T-Gedächtniszellen im Körper, um im Falle einer erneuten Infektion diese schnell und effektiv bekämpfen zu können. T-Gedächtniszellen werden anhand der Expression von CD44 charakterisiert. Typ I IFN spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung zu T-Gedächtniszellen, da es als drittes potentiell Signal nach TZR- und Co-Rezeptor-Stimulation bestimmte Gene reguliert, die für die Differenzierung zu T-Gedächtniszellen entscheidend sind<sup>62</sup>. So können beispielsweise IFNAR-defiziente CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Listerien-Infektionen nicht zu T-Gedächtniszellen differenzieren<sup>103</sup>. Eine Vorbehandlung mit IFN- $\beta$  hatte jedoch keinen Einfluss auf die Expression von CD44 (*Abbildung 18*). Um den Einfluss von Typ I IFN auf die Differenzierung und Funktion von T-Gedächtniszellen *in vivo* zu untersuchen, wurden die langfristigen Auswirkungen der einstündigen IFN-Stimulation auf T-Zell-Antworten über einen Zeitraum von 60 Tagen analysiert (*Abbildung 38*). Obwohl Typ I IFN eine wichtige Rolle bei der Differenzierung zu Gedächtniszellen und deren lytischer Aktivität spielt<sup>104,105</sup>, zeigte sich, dass eine kurzzeitige IFN-Stimulation bei T-Gedächtniszellen nicht zu verbesserten T-Zell-Antworten führte.

CD8<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung zu Effektorzellen, deren Aufgabe darin besteht, veränderte Zellen sowie infizierte oder Tumor-Zellen zu eliminieren. Effektorzellen töten Zielzellen über verschiedene Mechanismen, wie der Expression von Zytotoxinen, wie

Granzym B und Perforin, oder die Expression von Todes-Liganden, wie FasL und TRAIL. Ebenso wie die Effekte von Typ I IFN auf die Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, ist auch der beschriebene Einfluss auf die Expression von IFN- $\gamma$ , einem weiteren Effektormolekül, widersprüchlich. So kann Typ I IFN die Expression von IFN- $\gamma$  in T-Zellen unterstützen<sup>27, 62</sup>, während nach LCMV-Infektionen eine IFN- $\gamma$ -Antwort nicht detektierbar oder nur sehr gering ist<sup>106,107</sup>. Weitere Untersuchungen zeigten, dass Typ I IFN die Expression von IFN- $\gamma$  abhängig von STAT1 und STAT4 unterstützen oder inhibieren kann<sup>69,74</sup>. Eine einstündige Vorstimulation mit IFN- $\beta$  inhibierte in unseren Experimenten sowohl *in vitro* als auch nach der T-Zell-Aktivierung *in vivo* die Expression von IFN- $\gamma$  (*Abbildungen 13 und 38 E*). Auch die Expression des zytotoxischen Moleküls Granzym B sowie der Todes-Liganden FasL und TRAIL wurde durch eine IFN-Vorstimulation signifikant vermindert (*Abbildungen 13 und 14*). Zusätzlich zeigen IFN-vorstimulierte Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine verminderte Zytotoxizität (*Abbildungen 15 & 37 F*). Typ I IFN hemmt daher die Ausbildung der Effektorfunktionen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und daraus resultierend die Fähigkeit, Zielzellen zu töten.

#### 4.3 „Crosstalk“ zwischen TZR- und IFN-induzierten Signalwegen

Eine Bindung von Liganden an den TZR induziert eine Vielzahl verschiedener Signalwege, die u.a. zum Anstieg intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen und zur Aktivierung von MAP-Kinasen führen. Über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie AP-1, NFAT und NF $\kappa$ B werden Gene induziert, die Aktivierung, Proliferation, Effektorfunktion oder Apoptose regulieren. Typ I IFN induziert neben den Jak/STAT-Signalweg eine Vielzahl weiterer Signalwege. Diese Signalwege regulieren die Aktivierung von STAT-Molekülen oder arbeiten unabhängig von diesen<sup>20, 77</sup>. Zu diesen Signalwegen gehören der MAPK-, der PI3K-



sowie der NFκB-Signalweg<sup>77</sup>, die ebenfalls durch eine Stimulation des TZR induziert werden.

Der Kalzium-Signalweg wird über die Stimulation des TZR induziert. Dies führt zunächst zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem ER und dadurch zum Influx extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über in der Plasmamembran befindliche Kalziumkanäle. Neben der Aktivierung des Calcineurin/NFAT-Signalweges, werden der Ras/MAPK-Signalweg sowie die Aktivierung von NFκB beeinflusst<sup>47,48</sup>. Eine IFN-β-Vorstimulation inhibierte den TZR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in OT-I  $\text{CD8}^+$  T-Zellen (*Abbildung 21*). Typ I IFN führte dabei nicht zur Inhibition von Kalzium-Kanälen, da der Influx von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch Ionomycin nicht beeinflusst wurde (*Abbildung 22*). Vielmehr führte eine IFN-Stimulation zu einer verzögerten sowie verminderten Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem ER (*Abbildung 23*), die für den Influx extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen notwendig ist. Die Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx erfolgt spezifisch durch Typ I IFN, während Typ II IFN keinen Einfluss auf den TZR-induzierten Kalzium-Signalweg hat. Typ I und Typ II IFN binden an unterschiedliche Rezeptoren und induzieren Signalkaskaden, an denen ähnliche Moleküle beteiligt sind, die aber zu unterschiedlichen Genexpressionsmustern führen. Obwohl STAT1-Moleküle durch Typ I und Typ II IFN induziert werden, kann IFN-γ den  $\text{Ca}^{2+}$  Influx nach TZR-Stimulation nicht inhibieren (*Abbildung 25*).

$\text{Ca}^{2+}$ -Signale sind essentiell für die Produktion von IL-2, welches entscheidend für die klonale Expansion und Differenzierung naiver  $\text{CD8}^+$  T-Zellen zu Effektorzellen ist<sup>33</sup>. Die verminderte Induktion von IL-2, die zur verminderten Proliferation geführt hat, ist wahrscheinlich auf die Typ I IFN-vermittelte Inhibition des Kalzium-Signalweges zurückzuführen. Die Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Weges durch Typ I IFN, und damit die geringere Produktion von IL-2 scheinen daher essentiell für die inhibierenden Effekte von IFN auf  $\text{CD8}^+$  T Zellen zu sein.

Neben dem Kalzium-Signalweg wurde der Einfluss von Typ I IFN auf die MAP-Kinasen Erk, p38 und JNK sowie die Aktivierung von NFκB untersucht. Eine IFN-Vorstimulation führte zu einer verminderten Phosphorylierung von Erk, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von p38 und JNK (*Abbildungen 27 & 28*). Die Phosphorylierung von IκBα und somit die Aktivierung von NFκB wurde ebenfalls durch eine IFN-Stimulation vermindert (*Abbildung 28*). Typ I IFN führt daher zu einer verminderten Aktivierung des Ras/MAPK-Signalweges und NFκB, während die Aktivierung anderer MAPK, wie p38 und JNK, nicht beeinflusst wird. Der Ras/MAPK-Signalweg, der zur Aktivierung von Erk führt, wird über direkte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale induziert, da Aktivierung und Inaktivierung von Ras über  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Faktoren reguliert werden. Die Aktivierung von NFκB erfolgt über PKC-θ, die durch DAG, welches im Verlauf des Kalzium-Signalweges produziert wird, aktiviert werden kann. Die Typ I IFN-vermittelte Inhibition des TZR-induzierten Kalzium-Signalweges könnte daher auf die Aktivierung des Ras/MAPK-Signalweges sowie NFκB wirken. Typ I IFN kann den PI3K-Signalweg und daher über die Aktivierung von PKC-θ sowohl die Aktivierung von NFκB als auch JNK und p38 induzieren<sup>77</sup>. Die Analyse von T-Zellen, die für eine Stunde mit IFN-β stimuliert wurden, zeigte jedoch keine Phosphorylierung von IκBα und JNK. p38 lag sowohl in IFN-behandelten auch in unstimulierten Zellen phosphoryliert vor. Eine kurzzeitige IFN-Stimulation scheint daher keine Aktivierung dieser Signalmoleküle zu induzieren.

Die IFN-vermittelte Inhibition des Kalzium-Signalweges sowie der Aktivierung von Erk und NFκB lässt auf einen Crosstalk zwischen IFN- und TZR-induzierten Signalkaskaden schließen. Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Inhibition bestimmter TZR-stimulierter Signalwege kann die nach IFN-Stimulation beschriebene Rekrutierung der Signalmoleküle Zap70, CD45 und Lck zum IFNAR sein<sup>75</sup>. Wenn diese wichtigen Signalmoleküle nach einer TZR-Stimulation nicht zur Verfügung stehen, können bestimmte Signalwege nicht induziert werden. Eine IFN-Stimulation könnte jedoch auch Inhibitoren

induzieren, die direkt oder indirekt TZR-induzierte Signalwege hemmen. Die IFN-vermittelte Inhibition der TZR-induzierten Signalwege und daher der potentielle Crosstalk haben keinen Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen, führen jedoch zu einer verminderten Proliferation sowie Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

#### 4.4 Einfluss des „Crosstalks“ zwischen IFN- und TZR-Signalwegen auf die Geninduktion

Da Typ I IFN bestimmte TZR-induzierte Signalwege sowie die Proliferation und Effektorfunktion von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen inhibiert, wurde der potentielle Crosstalk zwischen TZR- und Typ I IFN-induzierten Signalwegen auf Geninduktionsebene näher untersucht.

Eine Stimulation des TZR induziert neben stimulatorischen, immer regulatorische Moleküle bzw. negative Feedback-Mechanismen, die auf die induzierten Signalwege wirken, diese notfalls inhibieren und somit eine genaue Regulierung von T-Zell-Antworten ermöglichen. TZR-induzierte Gene wurden durch die Stimulation mit Typ I IFN entweder nicht beeinflusst, vermindert oder verstärkt induziert (*Abbildung 30*). Es wurden 43 Gene identifiziert, die sowohl durch eine IFN-Stimulation auch als durch die Stimulation des TZR induziert wurden. Zu diesen Genen gehörten neben CD69 Gadd45 $\gamma$  und SOCS1. Gadd45 $\gamma$  spielt eine wichtige Rolle beim Zellzyklus sowie programmierten Zelltod. SOCS1 gehört zur Familie der Suppressor of Cytokine Signaling-Familie, die über negative Feedback-Mechanismen Zytokin-, aber auch TZR-induzierte Signalwege inhibieren und somit modulieren können<sup>108</sup>. Die Vorbehandlung mit Typ I IFN könnte dazu führen, dass regulatorische Mechanismen induziert werden, die eine Aktivierung verhindern, oder dass Signalmoleküle nicht zum richtigen Zeitpunkt aktiviert werden und somit das vollständige Ausbilden von T-Zell-Antworten nicht möglich ist. Bioinformatische Auswertungen weisen darauf hin, dass

negative Feedback-Mechanismen induziert werden (GO-Klassifizierung, persönliche Mitteilung Razif Gabdoulline, Biobase), die eine vollständige Aktivierung der TZR-Signalkaskade verhindern. Tatsächlich werden Proliferation und der Kalzium-Signalweg TZR-stimulierter T-Zellen nach einer sechsständigen IFN-Stimulation nicht inhibiert (*Abbildungen 9 & 26*), was darauf hinweist, dass negative Regulationsmechanismen direkt durch IFN stimuliert werden und nur kurzfristig zur Inhibition des TZR-Signalkaskade führen.

Typ I IFN führte zu einer verminderten Induktion von 254 TZR-induzierten Genen (*Abbildung 31*). Zu diesen gehörte das IL-2-Gen, dessen verminderte mRNA-Induktion sowie Expression nach einer IFN-Vorstimulation bereits gezeigt werden konnten (*Abbildung 19*). Zusätzlich wurde die mRNA-Induktion der Gene für CD160 und SLAMF sowie die für NFκB-Untereinheiten kodierenden Gene NFKB1 und REL untersucht. CD160 und Slamf sind Rezeptoren, die multifunktionelle Rollen bei der Differenzierung und Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielen<sup>90-92</sup>. Die Analyse zeigte, dass Typ I IFN die Induktion bestimmter Gene langfristig vermindern bzw. beeinflussen kann (CD160, Slamf, *Abbildungen 31 B&C*), während andere Gene nur kurzzeitig vermindert induziert werden (NFKB1, Rel, *Abbildungen 31 D&E*). Die Analyse der Geninduktion sechs Stunden nach TZR-Stimulation zeigte nur noch wenige Unterschiede zwischen IFN-vorstimulierten und nur TZR-stimulierten T-Zellen (*Daten nicht gezeigt*). Dies lässt vermuten, dass die Geninduktion eine Stunde nach TZR-Stimulation entscheidend bzw. prägend für langfristige Funktionen, wie Proliferation oder Effektorfunktion, ist. Die Gene, die durch eine IFN-Vorstimulation vermindert induziert wurden, spielen eine Rolle in verschiedenen Signalwegen, wie dem MAPK-Signalweg, dem Jak/STAT-Signalweg und Signalwegen, die Apoptose regulieren. Die Genprodukte von 17 der durch eine Typ I IFN-Stimulation vermindert induzierten Gene sind Bestandteile des TZR-Signalweges (*Abbildung 32*). Diese Genprodukte sind wichtige Signalmoleküle

verschiedener Signalwege, wie Ras, PI3K, p38 und I $\kappa$ B, die Transkriptionsfaktoren NFAT und NF $\kappa$ B sowie die Zytokine IL-2, IL-4, GM-CSF und TNF- $\alpha$ , die durch den TZR-Signalweg induziert werden. IL-2 und GM-CSF sind entscheidend für Homeostase und Proliferation von T-Zellen und könnten somit eine Ursache für die langfristigen Effekte der kurzzeitigen Veränderung in der Geninduktion sein.

Auch IFN-induzierte Gene können durch eine TZR-Stimulation beeinflusst werden. 52 IFN-induzierte Gene wurden durch eine IFN-Vorstimulation und anschließender TZR-Stimulation verstärkt induziert (*Abbildung 35*). CXCL10 war eines dieser Gene, dessen Genprodukt als Chemokin für die Rekrutierung von Immunzellen zum Infektionsort notwendig ist. Bereits eine alleinige IFN-Vorstimulation kann dieses Gen induzieren, wobei eine zusätzliche TZR-Stimulation die Induktion verstärken kann. Die Induktion von CXCL10 in CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Typ I IFN wurde bereits beschrieben<sup>62</sup>. 231 IFN-induzierte Gene wurden nach einer TZR-Stimulation vermindert induziert (*Abbildung 36*). Eine Studie mit humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte zeigen, dass eine TZR-Stimulation zu einer 10-fach verminderten Induktion von ISGs führen kann und somit antiproliferative Effekte von Typ I IFN aufgehoben werden können<sup>97</sup>. T-Zellen scheinen daher ebenfalls Mechanismen zu induzieren, die Typ I IFN-vermittelte Signalwege inhibieren oder direkt auf die Induktion von ISGs wirken. Weitere Untersuchungen, ob und welche IFN-induzierten Signalmoleküle- oder -wege durch eine TZR-Stimulation beeinflusst werden, sind notwendig.

Insgesamt zeigt die Analyse, dass sich der Crosstalk zwischen IFN- und TZR-induzierten Signalwegen auf Geninduktionsebene widerspiegelt. Die Typ I IFN-vermittelte Inhibition des Kalzium-Signalweges und der Aktivierung von Erk und NF $\kappa$ B, die vermutlich zu einer verminderten Induktion bestimmter TZR-stimulierter Gene führt, sowie die verminderte Induktion IFN-stimulierter Gene nach TZR-Aktivierung lassen auf inhibitorische Wechselwirkungen schließen. Möglicherweise existieren jedoch auch stimulatorische bzw.

synergistische Wechselwirkungen, da bestimmte Gene durch eine IFN- bzw. TZR-Stimulation verstärkt induziert wurden.

#### 4.5 Relevanz der beobachteten IFN-Effekte

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine einstündige Vorstimulation mit 500U/mL IFN- $\beta$  SIINFEKL-Streptamer-stimulierte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen beeinflusst. Die Analyse TZR-induzierte Signalwege sowie der Regulierung IFN- und TZR-induzierter Gene lassen auf einen „Crosstalk“ schließen. Dieser „Crosstalk“ hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung der T-Zellen, führte jedoch zu einer verminderten Proliferation und Effektorfunktion. Typ I IFN induziert dabei keine Toleranz-Mechanismen, da weder eindeutig Exhaustion noch Anergie nachgewiesen wurden (*Abbildungen 33*). Es zeigte sich jedoch, dass der Einfluss von Typ I IFN konzentrationsabhängig ist und Dauer und Zeitpunkt einer IFN-Stimulation sowie die zusätzliche Aktivierung von Co-Rezeptoren entscheidend sind.

Eine unvollständige Antigenstimulation oder eine fehlende Co-Stimulation können *in vivo* Anergie induzieren<sup>39</sup>. Co-Stimulationen über Rezeptoren, wie CD28, sind notwendig für die Ausbildung der immunologischen Synapse und um TZR-induzierte Signalwege zu verstärken<sup>26</sup>. Infektionen mit verschiedenen Viren können jedoch die Reifung von DCs sowie deren Expression von MHC- und co-stimulatorischen Molekülen inhibieren<sup>109-116</sup>. In unseren Versuchen hatte eine IFN-Vorstimulation keinen negativen Effekt auf die Proliferation, wenn CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch DCs, die Liganden für Co-Rezeptoren exprimieren, aktiviert wurden (*Abbildung 10*). Die Stimulation mit suboptimalen CD3 $\epsilon$  Antikörper-Konzentrationen führte hingegen zu einer Inhibition der Proliferation (*Abbildung 11*). Die Typ I IFN-vermittelte Inhibition ist daher möglicherweise ein Schutzmechanismus, um T-Zellen davor zu schützen, durch eine unvollständige Stimulation anerg zu werden und somit verminderte T-Zell-

Antworten zu induzieren. Es wäre vorstellbar, dass T-Zellen von Typ I IFN in eine Art „Standby-Modus“ versetzt, der erst durch eine vollständige Stimulation des TZR und von Co-Rezeptoren aufgehoben werden kann und dann zu optimalen T-Zell-Antworten führt. Dauer und Zeitpunkt einer IFN-Stimulation sind dabei entscheidend für den Einfluss von Typ I IFN auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen. So wurde bereits gezeigt, dass eine IFN-Stimulation vor der Stimulation des TZR die Proliferation deutlich vermindern kann<sup>73</sup>, während eine IFN-Stimulation während oder kurz nach einer TZR-Stimulation die Proliferation von T-Zellen verstärkt<sup>63,77</sup>. In unseren Versuchen zeigte sich, dass eine sechsstündige IFN-Vorstimulation weder den TZR-induzierten Kalzium-Signalweg noch die Proliferation inhibierte (*Abbildungen 9 & 26*). Die Typ I IFN-induzierte Inhibition scheint daher nur vorübergehend zu sein. Typ I IFN kann T-Zellen in den Zustand der „partial lymphocyte activation“ versetzen und beispielsweise die Expression von CD69 induzieren. Möglicherweise kann eine längere IFN-Stimulation T-Zellen bereits teilweise aktivieren, sodass T-Zellen auch im Falle einer unvollständigen Antigen-Stimulation oder fehlenden Co-Stimulation vollständig aktiviert werden können.

## 5. Material & Methoden

### 5.1. Geräte und Chemikalien

#### 5.1.1 Geräte

Autoklav	Belimed Dampfsterilisator 6-6-6 HS1, FD
Clean Benches	Heraeus, HeraSafe Typ HSB18, KS15 und HSP 18 Heraeus Sterilgard SG400E BDK Laminar-Flow Typ BDK-S 1500 und KS12
Kühlzentrifugen	Thermo Scientific Jouan CR412 Sigma 2-16K Sartorius
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore MilliQ
Durchflusszytometer	LSR II Becton Dickenson
Tischzentrifugen	Heraeus Biofuge pico Heraeus Sepatech Megafuge 1.0R
Vortexer	Heidolph REAX 2000
Wasserbad	Rowa Model Ro 3044
pH-Meter	M340, Beckman
Light Cycler	Light Cycler, Roche
Pipetten	Gilson Pipetman Labnet Biopette
Pipettierhilfen	Pipetboy IBS Integra Biosciences
autoMACS	Miltenyi
Netzgeräte	Biorad Power Pac 300
Blotapparatur	Transblot SD Semi-Dry Biorad



### 5.1.2 Chemikalien

Die benutzten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Alamone, Amersham Biosciences, Bayer, Biolabs, Bioline, BioLegend, Biorad, Difco, Gibco, Invitrogen, Merck, Miltenyi, Qiagen, R&D Systems, Roche, Sigma. Antikörper von Pharmingen, Santa Cruz, ebioscience, BioLegend und Beckton Dickinson wurden verwendet. Oligonukleotidsynthesen wurden von MWG durchgeführt.

### 5.2 Zellkulturmaterialien

Für das Arbeiten mit Zellen wurden Materialien von den Firmen Costar, Gibco, Greiner, Nunc und Seromed benutzt.

### 5.3 Computerprogramme

Das Erstellen von Texten, Grafiken und Tabellen erfolgte mit den Programmen Word, Powerpoint und Excel von Microsoft. Die Bearbeitung von Bilddateien wurde mit Adobe Photoshop 6 sowie Paint von Microsoft durchgeführt. q-PCR-Daten wurden mit dem Programm Exor 4 von Roche analysiert. Die Programme FACS Diva (Beckton Dickinson) und FlowJo 7.2 (tree star Inc.) dienten der Analyse der FACS Daten. Heat-Maps wurden mit Multiple Experiment Viewer (MEV, Multiple Array Viewer) erstellt. Die weitere Analyse der Microarray-Daten erfolgten mittels DAVID-Programm und in Zusammenarbeit mit Razif Gabdouline der Firma Biobase.

## 5.4 Sterilisation

Glasmaterialien wurden für 4h bei 180°C im Trockenschrank sterilisiert. Sämtliche Plastikwaren, wie Eppendorfg Gefäße, Pipettenspitzen und Lösungen wurden für 25min bei 121°C autoklaviert. Lösungen, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden sterilfiltriert (0,22µm Filter).

## 5.5 Zellkulturmedien und Zelllinien

### 5.5.1 Verwendete Zelllinien

EL-4: murine T-Zell-Tumorlinie

### 5.5.2 Medien und Lösungen

RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium: RPMI Pulver: 100mL 1M HEPES; 1,68 g/L NaHCO <sub>3</sub> ; pH 7,0-7,4
IMDM	Isocove's Modified Dulbecco's Medium: 517,65 g/L IMDM- Pulver: 3,02g/L NaHCO <sub>3</sub> ; pH 7,0-7,4
Pen/Strep (100x)	1,212g Penicillin, 200mL (10.000U/mL) 2g Streptomycin, 200mL (10mg/mL); zum Lösen mit NaOH auf pH 7,4 einstellen (Lagerung bei -20°C)
Glutamine (100x)	29,23mg/mL Glutamine; Lagerung bei -20°C
FCS	JRH Bioscience

### 5.5.3 Kultivierung von Zellen

Kultivierung in RPMI: primäre T-Zellen und dendritische Zellen

Kultivierung in IMDM: EL-4-Zellen

Primäre, aufgereinigte  $CD8^+$  T-Zellen wurden für die benannten Zeitpunkte mit den angegebenen Konzentrationen IFN- $\beta$ , IFN- $\alpha 4$  und IFN- $\gamma$  (rekombinant, aus transfizierten BHK Zelllinien) stimuliert und anschließend mit PBS gewaschen. Zur Stimulation des T-Zell-Rezeptors wurden die Zellen anschließend mit immobilisierten CD3 $\epsilon$  Antikörpern, mit SIINFEKL-Streptameren bzw. mit dem SIINFEKL-Peptid gepulsten dendritischen Zellen inkubiert. Die Zellen wurden in Medium mit 10% (v/v) FCS, 20mM Glutamine, 60 $\mu$ g/mL Penicillin und 100 $\mu$ g/mL Streptomycin (1% v/v) und  $\beta$ -Mercaptoethanol bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

## 5.6 Arbeiten mit isolierten murinen Immunzellen

### 5.6.1 Isolierung von Zellen aus der Milz

Sämtliche Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen mit Bakterien zu verhindern.

ACK Lyse-Puffer: 8,29g (0,15M) NH<sub>4</sub>Cl; 1g KHCO<sub>3</sub> (10mM), 37,2g Na<sub>2</sub>EDTA (0,1 mM);  
ad 1L H<sub>2</sub>O; pH7,2 -7,4;sterilfiltriert

OT-I bzw. C57Bl/6-Mäuse wurden mittels CO<sub>2</sub> getötet, die Milz präpariert und in eine Petri-Schale mit 5mL PBS/EDTA (2mM) überführt. Die Milzen wurden in einem Zellsieb (40 $\mu$ m)

mit Hilfe des Stempels einer Spritze zerdrückt. Die dadurch gewonnenen Zellen wurden in ein 15mL Falcon überführt und bei 1200rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 2mL ACK Lyse-Puffer resuspendiert und für 2 Minuten inkubiert, um Erythrozyten zu lysieren. Zum Abstoppen wurden 12mL PBS/EDTA (2mM) zugegeben und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend entweder in RPMI-Medium aufgenommen oder für die magnetische Aufreinigung von T-Zellen verwendet.

### **5.6.2 Isolation von Zellen aus Lymphknoten**

OT-I bzw. C57Bl/6-Mäuse wurden mittels CO<sub>2</sub> getötet, die Lymphknoten präpariert und in eine Petri-Schale mit 5mL PBS/EDTA (2mM) überführt. Die Lymphknoten wurden durch ein Zellsieb (70µm) mit Hilfe des Stempels einer Spritze zerdrückt. Die gewonnenen Zellen wurden bei 1200rpm für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in FACS- Puffer bzw. RPMI- Medium aufgenommen.

### **5.6.3 Aufreinigung von T-Zellen mittels magnetischer Separation**

Isolierungs-Puffer: PBS, 2mM EDTA, 0,5% (w/v) BSA, pH 7,2

Die Aufreinigung von T-Zellen erfolgte mittels magnetischer Separation unter Verwendung des Pan T cell isolation Kit II (Miltenyi) sowie dem autoMACS (Miltenyi). Zunächst wurde die Zellzahl der isolierten Milzzellen bestimmt und die Zellen in der entsprechenden Menge Isolierungs-Puffer (40µL pro 10<sup>7</sup> Zellen) aufgenommen, resuspendiert und gevortext. Anschließend wurden 10µL pro 10<sup>7</sup> Zellen Antikörper-Cocktail zugegeben, erneut resuspendiert und gevortext. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurden 30µL pro 10<sup>7</sup>

Zellen Isolationspuffer sowie 20µL Microbeads pro  $10^7$  Zellen zugegeben, erneut resuspendiert, gevortext und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde mit Isolations-Puffer auf 14mL aufgefüllt und für 10min bei 1200rpm und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1,5mL Isolations-Puffer aufgenommen und die Separation der T-Zellen erfolgte mit Hilfe des autoMACS und dem Programm „Depletes“. Die erhaltenen Zellen wurden bei 1200rpm für 10 Minuten zentrifugiert und in RPMI-Medium aufgenommen.

#### **5.6.4 Stimulation von murinen T-Zellen *in vitro***

Zur spezifischen Stimulation wurden pro Kavität einer 48-well-Platte  $2 \times 10^6$  aufgereinigte OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die angegebenen Zeitpunkte und sofern nicht anders angegeben mit 500U/mL IFN-β (rekombinant, aus transfizierten BHK Zelllinien) stimuliert und anschließend mit PBS gewaschen. Zur Stimulation des T-Zell-Rezeptors wurden die Zellen entweder mit immobilisierten CD3ε-Antikörpern, mit SIINFEKL-Streptameren, bestehend aus vernetzten MHC-I-Molekülen und dem SIINFEKL-Peptid, oder mit sortierten, SIINFEKL-Peptid gepulsten CD11c<sup>+</sup> dendritischen Zellen inkubiert. Zur Antikörper-Stimulation wurde 10µg Biotin-CD3ε-Antikörper (BD Pharmingen) in PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C in der Kavität einer 48-well-Platte immobilisiert. Nach dem Entfernen von PBS wurden die T-Zellen zu dem immobilisierten Antikörper gegeben. Zur Herstellung der SIINFEKL-Streptamere wurden pro Ansatz 4µL pMHC (10µg), 5µL Strep-Tactin (beides IBA) sowie 41µL RPMI-Medium für 45 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Zum Beladen der dendritischen Zellen wurde diese für eine Stunde mit 2,5µg SIINFEKL-Peptid bei 37°C inkubiert.

### 5.6.5 CFSE-Proliferationsassay

Die Proliferation der T-Zellen wurde mittels CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester)-Färbung analysiert. CFSE diffundiert passiv in Zellen und ist zunächst farblos sowie nicht fluoreszierend. Intrazelluläre Esterasen führen zur Abspaltung von Acetat-Gruppen, wodurch CFSE fluoresziert. Durch die Bindung an intrazelluläre Amine verbleibt CFSE in den Zellen und wird bei der Zellteilung zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben. Aufgereinigte OT-I T-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und entsprechend der Herstellerangaben mit 2µM CFSE (Invitrogen) in PBS für zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von Medium gestoppt, die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und anschließend entsprechend der Angaben stimuliert. 72 Stunden nach der Stimulation wurde die Proliferation entsprechend der CFSE-Färbung mittels Durchflusszytometrie bestimmt

### 5.6.6 *In vitro* CTL-Assay

OT-I T-Zellen wurden mittels magnetischer Separation aus Milzen aufgereinigt und für eine Stunde mit 500U/mL IFN-β behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend erfolgte die Stimulation des TZR mit SIINFEKL-Streptameren für 48 Stunden. EL-4-Zellen wurden mit 2µM CFSE (Invitrogen) für zehn Minuten bei 37°C und nach der Zugabe von 10mL Medium für fünf Minuten bei 4°C inkubiert. Nach zwei Waschschritten wurden die Zellen in Medium resuspendiert und für 16 Stunden mit OT-T T-Zellen in einem Effektor : Zielzell-Verhältnis von 50:1 bis 6,25:1 inkubiert. Die Zellen wurden für fünf Minuten mit 7-AAD (7-Aminoactinomycin) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. CFSE positive Zellen wurden als Zielzellen identifiziert. Die effektive Lyse der Zielzellen wurde anhand der Anzahl CFSE-7AAD doppelpositiver Zellen ermittelt.

## 5.7 Durchflusszytometrie (FACS) zur Analyse von Zellen und Sortierung von Zellen

### 5.7.1 Antikörper für Durchflusszytometrie zur Analyse von Zellen und Sortierung von Zellen

- anti-B220                      APC-Cy7 anti-mouse B220 (1:150), ebioscience
- anti-CD3                      FITC anti-mouse CD3 (1:300), BD Pharmingen
- anti-CD4                      APC anti-mouse CD4 (1:300), BD Pharmingen
- anti-CD8                      PE anti-mouse CD8 (1:800), ebioscience  
   APC-Cy7 anti-mouse CD8 (1:300), ebioscience  
   PerCPCy5.5 anti-mouse CD8 (1:400), ebioscience
- anti-CD11c                    PeCy7 anti-mouse CD11c (1:200), ebioscience
- anti-CD16/CD32,            anti- CD16/CD32 (1:500) molecular immunology  
(Fc-Block)
- anti-CD25                    PeCy5 anti-mouse CD25 (1:500), ebioscience
- anti-CD44                    APC-AF750 anti-mouse CD44 (1:800), ebioscience
- anti-CD62L                   PeCy7 anti-mouse CD62L (1:200), ebioscience  
   APC anti-mouse CD62L (1:4000), ebioscience
- anti-CD69                    FITC anti-mouse CD69 (1:200), ebioscience  
   PeCy7 anti-mouse CD69 (1:500), ebioscience
- anti-CD95                    PE anti-mouse CD95 (1:500), ebioscience
- anti-CD95L                   PeCy7 anti-mouse CD95L (1:500), ebioscience
- anti-CD127                   FITC anti-mouse CD127 (1:200), ebioscience
- anti-Granzyme B            FITC anti-mouse Granzyme B (1:4000), ebioscience  
   PeCy7 anti-mouse Granzyme B (1:800), ebioscience

- anti- IFNAR1            APC anti-mouse IFNAR1 (1:100), BioLegend
- anti-IFN- $\gamma$             FITC anti-mouse IFN- $\gamma$  (1:500), ebioscience  
eFlour450 anti-mouse IFN- $\gamma$  (1:400), ebioscience
- anti-IL-2                APC anti-mouse IL-2 (1:400), ebioscience  
Pacific Blue anti-mouse IL-2 (1:300), ebioscience
- anti-IL15R            APC anti-mouse IL15R (1:800), ebioscience
- anti-Perforin           APC anti-mouse Perforin (1:400), ebioscience
- anti-Thy1.1            PE anti-mouse Thy1.1 (1:2000), ebioscience
- anti-TRAIL            PE anti-mouse TRAIL (1:300), ebioscience

### 5.7.2 Durchflusszytometrie und Zell-Sortierung

FACS-Puffer: PBS, 2% FCS

$5 \times 10^5$  Zellen wurden in eine 96-well Platte mit V-Boden überführt und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden die Zellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln in 100 $\mu$ L Fc-Block inkubiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1200 rpm wurden die Zellen mit 100 $\mu$ L konjugiertem Antikörper für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, das Zellpellet in 300 $\mu$ L FACS-Puffer resuspendiert und die Zellen via LSR II (BD) analysiert oder ARIA (BD) sortiert. Um zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden, wurden die Zellen für 5 Minuten mit 5 $\mu$ L 7-AAD (ebioscience) inkubiert.



### 5.7.3 Analyse von intrazellulären Zytokinen

Isolierte Zellen wurden mittels Streptameren oder Ova-Peptid (2,5µM) stimuliert und für 4 bis 6 Stunden bei 37°C mit Brefeldin A inkubiert. Brefeldin A verhindert den Transport von Proteinen aus dem ER zur Zelloberfläche, wodurch eine Analyse intrazellulärer Zytokine erleichtert wird. Die Zellen wurden zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, in eine 96-well Platte mit V-Boden überführt und für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur mit Fc-Block inkubiert. Oberflächenmoleküle wurden nach einem Zentrifugations-Schritt gefärbt, indem die Zellen mit 100µL Antikörper-Lösung für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert wurden. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden 100µL Cytofix/Cytoperm (BD) pro Kavität zugegeben und für weitere 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit BD Perm/Wash Puffer (Endkonzentration 1x in Aqua dest.) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4°C im Dunklen mit den entsprechenden intrazellulären Antikörpern inkubiert, nochmals gewaschen und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

### 5.7.4 Messung der Kalzium-Mobilisierung mittels Durchflusszytometrie

Zur Messung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wurden aufgereinigte OT-I  $\text{CD8}^+$  T-Zellen für 45 Minuten mit 1µM Indo-1 AM (invitrogen) inkubiert. Indo-1 AM ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiver Farbstoff, der ohne gebundenes  $\text{Ca}^{2+}$  nach der Anregung im UV-Bereich blaue Fluoreszenz emittiert. Nach der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen erfolgt die Emission im violetten Farbbereich. Über das Verhältnis von Violett zu Blau kann die Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über die Zeit dargestellt werden. Anschließend wurden die Zellen mit 500U/mL IFN-β stimuliert oder unbehandelt gelassen. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Freisetzung von Kalzium gemessen. Die Zellen wurden erwärmt und zunächst für 20 Sekunden gemessen. Daraufhin wurden SIINFEKL-

Streptamere zu den Zellen gegeben und für weitere vier bis fünf Minuten die Mobilisierung von Kalzium gemessen. Eine Minute vor dem Ende der Messung wurde 1µg/mL Ionomycin (Sigma) zu den Zellen gegeben, um eine vollständige Freisetzung von Kalzium-Ionen zu ermöglichen.

Um die Freisetzung von Kalzium-Ionen aus intrazellulären Speichern zu bestimmen, wurden die Zellen vor der Messung in EGTA-haltigem (3mM) FACS-Puffer aufgenommen, um extrazelluläre Kalzium-Ionen zu binden. Die Zellen wurden wiederum für 20 Sekunden ohne Stimulus gemessen und daraufhin die SIINFEKL-Streptamere zugegeben. Nach der Freisetzung der Kalzium-Ionen wurde 1µg/mL Thapsigargin (Alamone) zur Blockierung von SERCA-Pumpen zu den Zellen gegeben, um eine vollständige Entleerung der intrazellulären Speicher zu induzieren. Zum Ende der Messung wurden 2mM CaCl<sub>2</sub> zu den Zellen gegeben, um extrazelluläre Kalzium-Ionen wieder zur Verfügung zu stellen.

## 5.8 RNA-Analysen

### 5.8.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy Kit von Qiagen entsprechend der Anweisungen des Herstellers. Hierfür wurden  $2 \times 10^6$  OT-I T-Zellen in 600µL β-Mercaptoethanol-haltigen RLT-Puffer homogenisiert, um RNasen zu inaktivieren, und mit 600µL 70%igen Ethanol vermischt. Diese Lösung wurde dann auf eine RNeasy Säule, an der die Gesamt-RNA gebunden wird, gegeben. Nach 15-sekündiger Zentrifugation bei 10.000rpm erfolgte die Elution in RNase-freiem Wasser.

### 5.8.2 RT-PCR

RNA wurde mittels Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads System für RT-PCR (Amersham, Biosciences) revers transkribiert. Hierfür wurden 5µg RNA in einem Endvolumen von 25 bis 30µL für 10 Minuten bei 65°C erhitzt, um sekundäre Strukturen zu denatuieren, und anschließend für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Die RNA-Lösung wurde in ein Gefäß mit first strand reaction beads, Oligo(dT) und DEPC-Wasser überführt. Diese Mischung hatte ein Endvolumen von 33µL. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur, wurde vorsichtig gevortex und zentrifugiert. Daraufhin wurde die Lösung bei 37°C für 60 Minuten inkubiert.

### 5.8.3 Quantitative Real-Time PCR

Verwendete Primer:

CD160 for	5'-GAGCTAAGCCAGTGGGAGTG-3'
CD160 rev	5'-CTCCTTTCTGGGATGCTGAG-3'
IL2 for	5'-CCCACTTCAAGCTCCACTTC-3'
IL-2 rev	5'-ATCCTGGGGAGTTTCAGGTT-3'
NFKB1 for	5'-CTGACCTGAGCCTTCTGGAC-3'
NFKB1 rev	5'-GCAGGCTATTGCTCATCACA-3'
Rel for	5'-TGCTGGACATTGAAGACTGC-3'
Rel rev	5'-CCCCTGACACTTCCACAGTT-3'

Slamf for	5'-CTCCATGAAGCTCAGCCAAT-3'
Slamf rev	5'-GATTACGCAGGTGCCATTCT-3'

Zur Durchführung der quantitativen Real Time PCR wurden 2µL cDNA (20ng bis 2µg), 10µL SYBR Green I (Invitrogen), forward und reverse Primer mit einer Endkonzentration von 0,3 bis 0,9µM und Wasser, um ein Endvolumen von 20µL zu erzielen, gemischt. Als Negativ-Kontrolle wurde PCR-grade Wasser verwendet. Die Real Time PCR wurde mittels Light Cycler (Roche) durchgeführt.

#### 5.8.4 Microarray-Analysen

Die Gesamt-RNA wurde wie bereits beschrieben (s. 5.8.1) isoliert und die Microarray-Analysen an der MHH, Institut für Physiologische Chemie, durchgeführt. Der verwendete „Whole Mouse Genome Oligo Microarray“ (G4122F, AMADID 014868, Agilent Technologies) beinhaltet 45018 Oligonucleotide Probes und die abgeleiteten Datensätze wurden in eine Excel-Ergebnisdatei integriert. Zur weiteren Analyse wurden nur annotierte Gene verwendet, die eine Signalstärke in unstimulierten Zellen von über 100 aufwiesen.

### 5.9 Proteinanalytik

#### 5.9.1 Zellaufschluss

Lysepuffer	9930µL 250mM Tris HCL; pH7.5; 50µL Triton pure; 2µL 0,1M PMSF (Proteinase-Inhibitor)
------------	--

OT-I T-Zellen wurden wie bereits beschrieben aufgereinigt und stimuliert. Die Stimulation der Zellen wurde mit eiskaltem PBS abgestoppt, die Zellen bei 1200rpm für 10 Minuten

zentrifugiert und das Pellet bei -20°C gelagert oder sofort zu Zellextrakten weiterverarbeitet. Das Pellet wurde in 20 bis 50 µL Lysepuffer resuspendiert und für 20 bis 30 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen bei 10.000rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet bei -20°C gelagert.

### 5.9.2 Proteinbestimmung (BCA-Assay)

Lösung A	1g BCA (Bicinchoninsäure); 160mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> x H <sub>2</sub> O (2g); 7mM Na <sub>2</sub> -Tartrat (1,6g); 110mM NaHCO <sub>3</sub> (0,95g); 1N NaOH; pH 11,25, ad 100mL H <sub>2</sub> O
Lösung B	CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O (4g), ad 100mL H <sub>2</sub> O
Gebrauchslösung	15mL Lösung A + 0,3mL Lösung B
Lysozym-Stocklösung	3mg/mL

In der ersten Reihe einer Mikrotiterplatte für optische Tests wurden 190µL, in die anderen Reihen jeweils 100µL Gebrauchslösung vorgelegt. Daraufhin wurden 10µL der jeweiligen Proteinextrakte, der Standardproteinlösung (Lysozym 3mg/mL) sowie H<sub>2</sub>O als Blank-Wert in die erste Reihe pipettiert. Mittels Multikanalpipette wurden die Proben resuspendiert und 100µL in die zweite Reihe pipettiert. In dieser Weise wurde zur weiteren Verdünnung bis zur letzten Reihe fortgefahren. Nach zehn- bis 30-minütiger Inkubation bei 50°C wurden die Proben mittels ELISA-Reader bei 562nm gemessen. Der Proteingehalt wurde anschließend anhand der Standardwerte der Lysozymlösung berechnet.

### 5.9.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Kathodenpuffer	20mM Tris/HCl (pH 8,25); 20mM Tricine; 0,02% SDS
Anodenpuffer	40mM Tris/HCl (pH 8,9)
Gelpuffer	3M Tris/HCl (pH 8,45); 0,3% SDS
Auftragspuffer	50mM Tris/HCl (pH 6,8); 4% SDS; 12% Glycerol; 2% $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,01% Serva-Blue

Zur Herstellung eines 10%igen Trenngels wurden 7,1mL Acrylamid/Bis-Acrylamid (49,5/1,5), 2mL Glycerin, 5mL Gelpuffer und 0,9mL H<sub>2</sub>O vermischt und zur Polymerisierung mit 15 $\mu$ L TEMED und 150 $\mu$ L 10%iges APS versetzt. Diese Lösung wurde zwischen vorbereitete Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Das Sammelgel wurde aus 1,2mL Acrylamid/Bis-Acrylamid (49,5/1,5), 1,5mL Gelpuffer, 3,5mL H<sub>2</sub>O sowie 10 $\mu$ L TEMED und 100 $\mu$ L 10 %iges APS zur Polymerisation angesetzt. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel in den verbleibenden Raum gegossen und ein Kamm zur Taschenbildung eingesetzt. Nach der vollständigen Polymerisation wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und der Anoden- bzw. Kathodenpuffer eingefüllt. Die Proben wurden im Auftragspuffer für 3 Minuten bei 65°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese lief bis zum Erreichen des Trenngels bei 80V und anschließend bei 125V.

### 5.9.4 Western Blot

Blotpuffer	25mM Tris/HCl; 192mM Glycin, 15% (v/v) Methanol
TBS-T	20mM Tris/HCl; pH 7,5; 137mM NaCl; 0,1% Tween-20

## Verwendete Antikörper

Aktin	Anti-Actin (mouse mAb), Calbiochem
Erk	p44/42 MAP Kinase, Cell Signaling
Phospho-Erk	phospho-p44/42 MAP-Kinase (Thr202/Tyr204), Cell Signaling
IkB $\alpha$	IkB $\alpha$ (44D4), Cell Signaling
Phospho-IkB $\alpha$	phosphor-IkB $\alpha$ (Ser32/36)
JNK	JNK, Santa Cruz
Phospho-JNK	phospho-JNK (Thr183/Tyr185)
p38	p38 MAP Kinase, Cell Signaling
Phospho-p38	phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182), Cell Signaling

Nachdem die Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, erfolgte der Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran im elektrischen Feld. Hierfür wurden das Gel und eine Hybond ECL-Membran (Amersham) für zehn Minuten in Blotpuffer äquilibriert und sechs Whatman 3mm Filterpapiere in der Größe des Gels in Blotpuffer angefeuchtet. In einer Semidry-Elektroblot-Apparatur wurden zunächst drei Whatman Filterpapiere gelegt, darauf die Membran, daraufhin das Gel und abschließend drei weitere Whatman-Filterpapiere. Der Transfer der Proteine erfolgte für 30 Minuten bei 10V. Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen wurde die Membran für zwei Stunden in 10% FCS in TBS-T bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde für eine Stunde mit dem primären Antikörper und nach drei zehnminütigen Waschschritten mit 10% FCS in TBS-T für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper (gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) inkubiert. Nach drei weiteren

Waschschritten wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe mittels einminütiger Inkubation mit ECL Lösung (1:1 Mischung beider Lösungen, Amersham) nachgewiesen. Die Oxidation von Luminol kann durch Exposition eines Films (Hyperfilm ECL, Amersham) sichtbar gemacht werden. Nach der Analyse eines Proteins wurde die Membran gestrippt, um weitere Proteine nachzuweisen. Hierfür wurde die Membran für 20 Minuten mit Re-Blot Plus mild (1:10 in H<sub>2</sub>O verdünnt) inkubiert und zweimal für 15 Minuten mit 10% FCS in TBS-T geblockt. Daraufhin konnte der Nachweis weiterer Proteine erfolgen.

## 5.10 In vivo-Versuche

### 5.10.1 Verwendete Maus-Linien

Um den Effekt einer IFN-Vorstimulation auf T-Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurden Thy1.1 x OT-I-T-Zellen i.v. in Wild-Typ (w.t.) Mäuse injiziert. Die Aktivierung der T-Zellen erfolgte mittels sortierter CD11c<sup>+</sup> DCs aus IFNAR<sup>-/-</sup>-Mäusen. W.t. C57BL/6-Mäuse wurden von Harlan bezogen. OT-I, Thy1.1 x OT-I und IFNAR<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden am HZI Braunschweig gezüchtet.

### 5.10.2 In vivo-Modell

Für jedes Experiment wurden mindestens drei Mäuse pro Gruppe verwendet. CD11c<sup>+</sup> DCs wurden aus den Milzen von IFNAR<sup>-/-</sup>-Mäusen sortiert und 5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro w.t. Maus i.v. injiziert. Nach 24 Stunden wurden Thy1.1 x OT-I T-Zellen aus Milzen mittels magnetischer Separation aufgereinigt, mit CFSE gefärbt und für eine Stunde mit 500U/mL IFN-β stimuliert oder unbehandelt belassen. Pro w.t. Maus wurden 2 x 10<sup>6</sup> T-Zellen i.v. injiziert. Nach zwei, drei, sechs und elf Tagen wurden die w.t. Mäuse mittels CO<sub>2</sub> getötet und die Milzen isoliert.



20, 40 und 60 Tage nach dem Transfer der Thy1.1 x OT-I T-Zellen wurden erneut  $5 \times 10^5$  CD11c<sup>+</sup> DCs aus IFNAR<sup>-/-</sup>-Mäusen i.v. in die w.t. Mäuse zur Restimulation der T-Zellen injiziert. Nach jeweils zwei Tagen wurden die w.t. Mäuse mittels CO<sub>2</sub> getötet und die Milzen isoliert. Die Anzahl der Thy1.1 x OT-I T-Zellen wurde mittels TruCount Beads (BD), die Proliferation anhand der CFSE-Färbung und die Expression von Aktivierungsmarkern sowie IFN-γ wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

### 5.10.3 *In vivo* CTL (Cytotoxic T cell) Assay

Um zu untersuchen, welchen Effekt eine IFN-Stimulation auf die Fähigkeit Zielzellen zu töten hat, wurden *in vivo* CTL Assays durchgeführt. Wie bereits beschrieben wurden CD11c<sup>+</sup> DCs aus IFNAR<sup>-/-</sup>-Mäusen i.v. in w.t. Mäuse injiziert und einen Tag später IFN-behandelte oder unbehandelte Thy1.1 x OT-I T-Zellen injiziert. An Tag 1 nach dem T-Zell-Transfer wurden Milzen aus naiven w.t. Mäusen isoliert und 20mL Zellsuspension hergestellt. 10mL dieser Suspension wurden für 45 Minuten bei 37°C mit 10μL SIINFEKL-Peptid inkubiert, während die anderen 10mL ohne Peptid belassen wurden. Anschließend wurde mit PBS auf 45mL aufgefüllt, bei 1200rpm für fünf Minuten zentrifugiert und die Pellets wurden in 5mL PBS resuspendiert. Die Zellen, die mit dem Peptid inkubiert wurden, wurden mit hohen Konzentrationen CFSE (1:2000, CFSE<sup>high</sup>), die anderen Zellen mit niedrigen Konzentrationen CFSE (1:20.000, CFSE<sup>low</sup>) behandelt. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei 37°C, wurden 10mL Medium zu den Zellen gegeben und für weitere fünf Minuten bei 4°C inkubiert. Nach zwei Waschschritten wurden die Pellets in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen pro 100μL in PBS aufgenommen. Beide Zellsuspensionen wurden 1:1 gemischt und 100μL i.v. in w.t. Mäuse injiziert, in die ein Tag zuvor die T-Zellen transferiert wurden. 16 Stunden nach der Injektion der CFSE-gefärbten Zellen wurden die Mäuse getötet, die Zellen aus den Milzen

isoliert und die CFSE-Färbung überprüft. Die Analyse mittels Durchflusszytometrie zeigte zwei Peaks entsprechend der hohen und niedrigen Konzentrationen an CFSE. Naive Mäuse, in die keine DCs und keine T-Zellen injiziert wurden, zeigten die gleichen Prozentzahlen an CFSE<sup>high</sup> und CFSE<sup>low</sup> Zellen. Bei Mäusen, in die Thy1.1 x OT-I T-Zellen injiziert wurden, verringerte sich der Anteil an CFSE<sup>high</sup>- Zellen, die mit dem SIINFEKL-Peptid beladen waren.

### 5.11 Statistische Analysen

Signifikanzen wurden mittels Student's t-Test ermittelt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 6. Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> Isaacs, A. & Lindenmann, J., Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147 (927), 258-267 (1957).
- <sup>2</sup> Liu, Y.J., IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23, 275-306 (2005).
- <sup>3</sup> Perry, A.K., Chen, G., Zheng, D., Tang, H., & Cheng, G., The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Res* 15 (6), 407-422 (2005).
- <sup>4</sup> Pestka, S., Langer, J.A., Zoon, K.C., & Samuel, C.E., Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* 56, 727-777 (1987).
- <sup>5</sup> Vilcek, J.T., Cytokines in 1995. *Cytokine Growth Factor Rev* 7 (1), 103-106 (1996).
- <sup>6</sup> Theofilopoulos, A.N., Baccala, R., Beutler, B., & Kono, D.H., Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 23, 307-336 (2005).
- <sup>7</sup> Mogensen, K.E., Lewerenz, M., Reboul, J., Lutfalla, G., & Uze, G., The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *J Interferon Cytokine Res* 19 (10), 1069-1098 (1999).
- <sup>8</sup> Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M., & Stark, G.R., Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264 (5164), 1415-1421 (1994).
- <sup>9</sup> Bach, E.A., Aguet, M., & Schreiber, R.D., The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15, 563-591 (1997).
- <sup>10</sup> Ikeda, H., Old, L.J., & Schreiber, R.D., The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 13 (2), 95-109 (2002).
- <sup>11</sup> Kotenko, S.V. *et al.*, IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 4 (1), 69-77 (2003).
- <sup>12</sup> Vilcek, J., Boosting p53 with interferon and viruses. *Nat Immunol* 4 (9), 825-826 (2003).
- <sup>13</sup> Stark, J.J. *et al.*, Interferon-alpha and chemohormonal therapy for patients with advanced melanoma: final results of a phase I-II study of the Cancer Biotherapy Research Group and the Mid-Atlantic Oncology Program. *Cancer* 82 (9), 1677-1681 (1998).

- 14 Zhang, P. *et al.*, Expression of IFN-gamma and its receptor alpha in the peripheral blood of patients with chronic hepatitis C. *Chin Med J (Engl)* 117 (1), 79-82 (2004).
- 15 Bluysen, A.R., Durbin, J.E., & Levy, D.E., ISGF3 gamma p48, a specificity switch for interferon activated transcription factors. *Cytokine Growth Factor Rev* 7 (1), 11-17 (1996).
- 16 Kessler, D.S., Veals, S.A., Fu, X.Y., & Levy, D.E., Interferon-alpha regulates nuclear translocation and DNA-binding affinity of ISGF3, a multimeric transcriptional activator. *Genes Dev* 4 (10), 1753-1765 (1990).
- 17 Williams, B.R., Signal transduction and transcriptional regulation of interferon-alpha-stimulated genes. *J Interferon Res* 11 (4), 207-213 (1991).
- 18 Decker, T., Lew, D.J., & Darnell, J.E., Jr., Two distinct alpha-interferon-dependent signal transduction pathways may contribute to activation of transcription of the guanylate-binding protein gene. *Mol Cell Biol* 11 (10), 5147-5153 (1991).
- 19 Lewin, A.R., Reid, L.E., McMahon, M., Stark, G.R., & Kerr, I.M., Molecular analysis of a human interferon-inducible gene family. *Eur J Biochem* 199 (2), 417-423 (1991).
- 20 Plataniias, L.C., Uddin, S., Yetter, A., Sun, X.J., & White, M.F., The type I interferon receptor mediates tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 2. *J Biol Chem* 271 (1), 278-282 (1996).
- 21 Buckwalter, M.R. & Albert, M.L., Orchestration of the immune response by dendritic cells. *Curr Biol* 19 (9), R355-361 (2009).
- 22 Lafferty, K.J., Theory of allogeneic reactivity and its relevance to the T-cell response to normal and oncogenic cells. *Adv Pathobiol* 4, 86-97 (1976).
- 23 Croft, M., Bradley, L.M., & Swain, S.L., Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J Immunol* 152 (6), 2675-2685 (1994).
- 24 Harding, F.A., McArthur, J.G., Gross, J.A., Raulet, D.H., & Allison, J.P., CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356 (6370), 607-609 (1992).
- 25 Pardigon, N. *et al.*, Role of co-stimulation in CD8+ T cell activation. *Int Immunol* 10 (5), 619-630 (1998).
- 26 Kiefer, F., Vogel, W.F., & Arnold, R., Signal transduction and co-stimulatory pathways. *Transpl Immunol* 9 (2-4), 69-82 (2002).
- 27 Curtsinger, J.M., Valenzuela, J.O., Agarwal, P., Lins, D., & Mescher, M.F., Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol* 174 (8), 4465-4469 (2005).

- 28 Ziegler, S.F., Ramsdell, F., & Alderson, M.R., The activation antigen CD69. *Stem Cells* 12 (5), 456-465 (1994).
- 29 Warnock, R.A. *et al.*, The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. *J Exp Med* 191 (1), 77-88 (2000).
- 30 Sallusto, F., Geginat, J., & Lanzavecchia, A., Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22, 745-763 (2004).
- 31 Jung, C.G., Miyamoto, T., Tsumagari, T., & Agui, T., Genetic association between low expression phenotype of CD62L (L-selectin) in peripheral CD4<sup>+</sup> T cells and the thid (T-helper immunodeficiency) phenotype in the LEC rat. *Exp Anim* 50 (4), 337-340 (2001).
- 32 Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T., & Taniguchi, T., The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol* 11, 245-268 (1993).
- 33 Cousens, L.P., Orange, J.S., & Biron, C.A., Endogenous IL-2 contributes to T cell expansion and IFN-gamma production during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* 155 (12), 5690-5699 (1995).
- 34 Barry, M. & Bleackley, R.C., Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2 (6), 401-409 (2002).
- 35 Kaech, S.M., Hemby, S., Kersh, E., & Ahmed, R., Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 111 (6), 837-851 (2002).
- 36 Lefrancois, L., Klein, J.R., Paetkau, V., & Bevan, M.J., Antigen-independent activation of memory cytotoxic T cells by interleukin 2. *J Immunol* 132 (4), 1845-1850 (1984).
- 37 Kaech, S.M. & Ahmed, R., Immunology. CD8 T cells remember with a little help. *Science* 300 (5617), 263-265 (2003).
- 38 Lefrancois, L., Marzo, A.L., Masopust, D., Schluns, K.S., & Vezy, V., Migration of primary and memory CD8 T cells. *Adv Exp Med Biol* 512, 141-146 (2002).
- 39 Schwartz, R.H., T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21, 305-334 (2003).
- 40 Blackburn, S.D. *et al.*, Tissue-specific differences in PD-1 and PD-L1 expression during chronic viral infection: implications for CD8 T-cell exhaustion. *J Virol* 84 (4), 2078-2089.
- 41 Davis, M.M. *et al.*, TCR recognition and selection in vivo. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1, 119-128 (1989).

- 42 Davis, S.J. & van der Merwe, P.A., The kinetic-segregation model: TCR triggering  
and beyond. *Nat Immunol* 7 (8), 803-809 (2006).
- 43 Weiss, A., TCR signal transduction: opening the black box. *J Immunol* 183 (8), 4821-  
4827 (2009).
- 44 Nel, A.E., T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components,  
signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. *J*  
*Allergy Clin Immunol* 109 (5), 758-770 (2002).
- 45 Feske, S., Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol*  
7 (9), 690-702 (2007).
- 46 Scharenberg, A.M. *et al.*, Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns-3,4,5-  
P3)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated  
inhibitory signals. *EMBO J* 17 (7), 1961-1972 (1998).
- 47 Oh-hora, M. & Rao, A., Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 20  
(3), 250-258 (2008).
- 48 Oh-hora, M. & Rao, A., The calcium/NFAT pathway: role in development and  
function of regulatory T cells. *Microbes Infect* 11 (5), 612-619 (2009).
- 49 Gwack, Y., Feske, S., Srikanth, S., Hogan, P.G., & Rao, A., Signalling to  
transcription: store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell*  
*Calcium* 42 (2), 145-156 (2007).
- 50 Chawla, S. & Bading, H., CREB/CBP and SRE-interacting transcriptional regulators  
are fast on-off switches: duration of calcium transients specifies the magnitude of  
transcriptional responses. *J Neurochem* 79 (4), 849-858 (2001).
- 51 Hardingham, G.E., Cruzalegui, F.H., Chawla, S., & Bading, H., Mechanisms  
controlling gene expression by nuclear calcium signals. *Cell Calcium* 23 (2-3), 131-  
134 (1998).
- 52 Bivona, T.G. *et al.*, Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by  
means of RasGRP1. *Nature* 424 (6949), 694-698 (2003).
- 53 Khoshnan, A., Bae, D., Tindell, C.A., & Nel, A.E., The physical association of protein  
kinase C theta with a lipid raft-associated inhibitor of kappa B factor kinase (IKK)  
complex plays a role in the activation of the NF-kappa B cascade by TCR and CD28. *J*  
*Immunol* 165 (12), 6933-6940 (2000).
- 54 DiDonato, J.A., IKK alpha on center stage. *Sci STKE* 2001 (97), pe1 (2001).
- 55 Mercurio, F. *et al.*, IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for  
NF-kappaB activation. *Science* 278 (5339), 860-866 (1997).

- 56 Le Bon, A. *et al.*, Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8<sup>+</sup> T cell response during cross-priming. *J Immunol* 176 (8), 4682-4689 (2006).
- 57 Quigley, M., Huang, X., & Yang, Y., STAT1 signaling in CD8 T cells is required for their clonal expansion and memory formation following viral infection in vivo. *J Immunol* 180 (4), 2158-2164 (2008).
- 58 Montoya, M. *et al.*, Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* 99 (9), 3263-3271 (2002).
- 59 Zietara, N. *et al.*, Absence of IFN-beta impairs antigen presentation capacity of splenic dendritic cells via down-regulation of heat shock protein 70. *J Immunol* 183 (2), 1099-1109 (2009).
- 60 Ito, A. *et al.*, Generation of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes from healthy individuals with peptide-pulsed dendritic cells. *J Gastroenterol Hepatol* 16 (3), 309-316 (2001).
- 61 Mattei, F., Schiavoni, G., Belardelli, F., & Tough, D.F., IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *J Immunol* 167 (3), 1179-1187 (2001).
- 62 Agarwal, P. *et al.*, Gene regulation and chromatin remodeling by IL-12 and type I IFN in programming for CD8 T cell effector function and memory. *J Immunol* 183 (3), 1695-1704 (2009).
- 63 Kolumam, G.A., Thomas, S., Thompson, L.J., Sprent, J., & Murali-Krishna, K., Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med* 202 (5), 637-650 (2005).
- 64 Aichele, P. *et al.*, CD8 T cells specific for lymphocytic choriomeningitis virus require type I IFN receptor for clonal expansion. *J Immunol* 176 (8), 4525-4529 (2006).
- 65 Thompson, L.J., Kolumam, G.A., Thomas, S., & Murali-Krishna, K., Innate inflammatory signals induced by various pathogens differentially dictate the IFN-I dependence of CD8 T cells for clonal expansion and memory formation. *J Immunol* 177 (3), 1746-1754 (2006).
- 66 Tanabe, Y. *et al.*, Cutting edge: role of STAT1, STAT3, and STAT5 in IFN-alpha beta responses in T lymphocytes. *J Immunol* 174 (2), 609-613 (2005).
- 67 Sprent, J., Zhang, X., Sun, S., & Tough, D., T-cell turnover in vivo and the role of cytokines. *Immunol Lett* 65 (1-2), 21-25 (1999).
- 68 Sun, S. & Sprent, J., Role of type I interferons in T cell activation induced by CpG DNA. *Curr Top Microbiol Immunol* 247, 107-117 (2000).



- 69 Gil, M.P., Salomon, R., Louten, J., & Biron, C.A., Modulation of STAT1 protein levels: a mechanism shaping CD8 T-cell responses in vivo. *Blood* 107 (3), 987-993 (2006).
- 70 Bochtler, P., Kroger, A., Schirmbeck, R., & Reimann, J., Type I IFN-induced, NKT cell-mediated negative control of CD8 T cell priming by dendritic cells. *J Immunol* 181 (3), 1633-1643 (2008).
- 71 Bahl, K. *et al.*, IFN-induced attrition of CD8 T cells in the presence or absence of cognate antigen during the early stages of viral infections. *J Immunol* 176 (7), 4284-4295 (2006).
- 72 Kamphuis, E., Junt, T., Waibler, Z., Forster, R., & Kalinke, U., Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia. *Blood* 108 (10), 3253-3261 (2006).
- 73 Marshall, H.D., Urban, S.L., & Welsh, R.M., Virus-induced transient immune suppression and the inhibition of T cell proliferation by type I interferon. *J Virol* 85 (12), 5929-5939.
- 74 Nguyen, K.B. *et al.*, Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox. *Nat Immunol* 1 (1), 70-76 (2000).
- 75 Petricoin, E.F., 3rd *et al.*, Antiproliferative action of interferon-alpha requires components of T-cell-receptor signalling. *Nature* 390 (6660), 629-632 (1997).
- 76 Kadereit, S. *et al.*, Negative regulation of CD8+ T cell function by the IFN-induced and double-stranded RNA-activated kinase PKR. *J Immunol* 165 (12), 6896-6901 (2000).
- 77 Plataniias, L.C., The p38 mitogen-activated protein kinase pathway and its role in interferon signaling. *Pharmacol Ther* 98 (2), 129-142 (2003).
- 78 Le Bon, A. *et al.*, Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN. *J Immunol* 176 (4), 2074-2078 (2006).
- 79 Le Bon, A. & Tough, D.F., Type I interferon as a stimulus for cross-priming. *Cytokine Growth Factor Rev* 19 (1), 33-40 (2008).
- 80 Asselin-Paturel, C. *et al.*, Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J Exp Med* 201 (7), 1157-1167 (2005).
- 81 Fink, K. *et al.*, Early type I interferon-mediated signals on B cells specifically enhance antiviral humoral responses. *Eur J Immunol* 36 (8), 2094-2105 (2006).
- 82 Sampson, L.L., Heuser, J., & Brown, E.J., Cytokine regulation of complement receptor-mediated ingestion by mouse peritoneal macrophages. M-CSF and IL-4 activate phagocytosis by a common mechanism requiring autostimulation by IFN-beta. *J Immunol* 146 (3), 1005-1013 (1991).



- 83 Van Wauwe, J.P., De Mey, J.R., & Goossens, J.G., OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. *J Immunol* 124 (6), 2708-2713 (1980).
- 84 Wang, X. *et al.*, Dynamics of proximal signaling events after TCR/CD8-mediated induction of proliferation or apoptosis in mature CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 180 (10), 6703-6712 (2008).
- 85 Geppert, T.D. & Lipsky, P.E., Immobilized anti-CD3-induced T cell growth: comparison of the frequency of responding cells within various T cell subsets. *Cell Immunol* 133 (1), 206-218 (1991).
- 86 van Lier, R.A., Brouwer, M., Rebel, V.I., van Noesel, C.J., & Aarden, L.A., Immobilized anti-CD3 monoclonal antibodies induce accessory cell-independent lymphokine production, proliferation and helper activity in human T lymphocytes. *Immunology* 68 (1), 45-50 (1989).
- 87 McNally, J.M. *et al.*, Attrition of bystander CD8 T cells during virus-induced T-cell and interferon responses. *J Virol* 75 (13), 5965-5976 (2001).
- 88 Wijesundara, D.K., Kumar, S., Alsharifi, M., Mullbacher, A., & Regner, M., Antigen-specific activation thresholds of CD8<sup>+</sup> T cells are independent of IFN-I-mediated partial lymphocyte activation. *Int Immunol* 22 (9), 757-767.
- 89 Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., Goodnow, C.C., & Healy, J.I., Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* 386 (6627), 855-858 (1997).
- 90 Nikolova, M., Marie-Cardine, A., Boumsell, L., & Bensussan, A., BY55/CD160 acts as a co-receptor in TCR signal transduction of a human circulating cytotoxic effector T lymphocyte subset lacking CD28 expression. *Int Immunol* 14 (5), 445-451 (2002).
- 91 Rey, J. *et al.*, The co-expression of 2B4 (CD244) and CD160 delineates a subpopulation of human CD8<sup>+</sup> T cells with a potent CD160-mediated cytolytic effector function. *Eur J Immunol* 36 (9), 2359-2366 (2006).
- 92 Detre, C., Keszei, M., Romero, X., Tsokos, G.C., & Terhorst, C., SLAM family receptors and the SLAM-associated protein (SAP) modulate T cell functions. *Semin Immunopathol* 32 (2), 157-171.
- 93 Schwartz, R.H., Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* 184 (1), 1-8 (1996).
- 94 Macian, F. *et al.*, Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 109 (6), 719-731 (2002).

- 95 Terawaki, S. *et al.*, IFN- $\alpha$  directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity. *J Immunol* 186 (5), 2772-2779.
- 96 Richter, K., Agnellini, P., & Oxenius, A., On the role of the inhibitory receptor LAG-3 in acute and chronic LCMV infection. *Int Immunol* 22 (1), 13-23.
- 97 Dondi, E., Rogge, L., Lutfalla, G., Uze, G., & Pellegrini, S., Down-modulation of responses to type I IFN upon T cell activation. *J Immunol* 170 (2), 749-756 (2003).
- 98 Tough, D.F., Borrow, P., & Sprent, J., Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science* 272 (5270), 1947-1950 (1996).
- 99 Radvanyi, L.G. *et al.*, CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J Immunol* 156 (5), 1788-1798 (1996).
- 100 Van Parijs, L., Peterson, D.A., & Abbas, A.K., The Fas/Fas ligand pathway and Bcl-2 regulate T cell responses to model self and foreign antigens. *Immunity* 8 (2), 265-274 (1998).
- 101 Van Parijs, L. *et al.*, Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity* 11 (3), 281-288 (1999).
- 102 Boise, L.H. *et al.*, CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-xL. *Immunity*. 1995. 3: 87-98. *J Immunol* 185 (7), 3788-3799.
- 103 Xiao, Z., Casey, K.A., Jameson, S.C., Curtsinger, J.M., & Mescher, M.F., Programming for CD8 T cell memory development requires IL-12 or type I IFN. *J Immunol* 182 (5), 2786-2794 (2009).
- 104 Kohlmeier, J.E., Cookenham, T., Roberts, A.D., Miller, S.C., & Woodland, D.L., Type I interferons regulate cytolytic activity of memory CD8(+) T cells in the lung airways during respiratory virus challenge. *Immunity* 33 (1), 96-105.
- 105 Ramos, H.J. *et al.*, Reciprocal responsiveness to interleukin-12 and interferon- $\alpha$  specifies human CD8<sup>+</sup> effector versus central memory T-cell fates. *Blood* 113 (22), 5516-5525 (2009).
- 106 Cousens, L.P. *et al.*, Two roads diverged: interferon  $\alpha/\beta$ - and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon  $\gamma$  responses during viral infection. *J Exp Med* 189 (8), 1315-1328 (1999).
- 107 Pien, G.C., Nguyen, K.B., Malmgaard, L., Satoskar, A.R., & Biron, C.A., A unique mechanism for innate cytokine promotion of T cell responses to viral infections. *J Immunol* 169 (10), 5827-5837 (2002).
- 108 Palmer, D.C. & Restifo, N.P., Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends Immunol* 30 (12), 592-602 (2009).

- 109 Andrews, D.M., Andoniou, C.E., Granucci, F., Ricciardi-Castagnoli, P., & Degli-Esposti, M.A., Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. *Nat Immunol* 2 (11), 1077-1084 (2001).
- 110 Engelmayer, J. *et al.*, Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J Immunol* 163 (12), 6762-6768 (1999).
- 111 Moutaftsi, M., Mehl, A.M., Borysiewicz, L.K., & Tabi, Z., Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 99 (8), 2913-2921 (2002).
- 112 Munir, S. *et al.*, Nonstructural proteins 1 and 2 of respiratory syncytial virus suppress maturation of human dendritic cells. *J Virol* 82 (17), 8780-8796 (2008).
- 113 Newton, K.R. *et al.*, Human dendritic cells infected with an adenoviral vector suppress proliferation of autologous and allogeneic T cells. *Immunology* 125 (4), 469-479 (2008).
- 114 Servet-Delprat, C. *et al.*, Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand-activated human dendritic cells. *J Immunol* 164 (4), 1753-1760 (2000).
- 115 Sevilla, N., McGavern, D.B., Teng, C., Kunz, S., & Oldstone, M.B., Viral targeting of hematopoietic progenitors and inhibition of DC maturation as a dual strategy for immune subversion. *J Clin Invest* 113 (5), 737-745 (2004).
- 116 Smith, A.P. *et al.*, Viral replication-independent blockade of dendritic cell maturation and interleukin-12 production by human herpesvirus 6. *J Virol* 79 (5), 2807-2813 (2005).

## Abbildungen

Abbildung 1: Perry, A.K., Chen, G., Zheng, D., Tang, H., & Cheng, G., The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Res* 15 (6), 407-422 (2005)

Abbildung 2: Takaoka, A. & Yanai, H., Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol* 8 (6), 907-922 (2006)

Abbildung 3: Barry, M. & Bleackley, R.C., Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2 (6), 401-409 (2002)

Abbildung 5: Oh-hora, M. & Rao, A., Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 20 (3), 250-258 (2008)

## 7. Appendix

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> Signalwege, die zur Produktion von Typ I IFN führen.....	4
<b>Abbildung 2</b> Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges und weiterer Signalkaskaden durch Interferone .....	7
<b>Abbildung 3</b> Das Töten von Zielzellen über Granzym B und Fas-vermittelte Apoptose-Induktion .....	11
<b>Abbildung 4</b> T-Zell-Rezeptor-induzierte Signalwege.....	14
<b>Abbildung 5</b> Der TZR-vermittelte $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg.....	16
<b>Abbildung 6</b> Typ I Interferone inhibiert die Proliferation von $\text{CD8}^+$ T-Zellen .....	25
<b>Abbildung 7</b> Typ I IFN-Stimulation führt nicht zur Internalisierung des TZR .....	26
<b>Abbildung 8</b> Proliferation von $\text{CD8}^+$ T-Zellen wird durch geringe Mengen IFN- $\beta$ nicht beeinflusst.....	27
<b>Abbildung 9</b> Einfluss von Zeitpunkt und Dauer der IFN- $\beta$ -Stimulation auf die Proliferation von $\text{CD8}^+$ T-Zellen .....	29
<b>Abbildung 10</b> IFN- $\beta$ hat keinen Effekt auf die Proliferation von T-Zellen nach Stimulation mit dendritischen Zellen.....	30
<b>Abbildung 11</b> IFN- $\beta$ Stimulation inhibiert die Proliferation bei suboptimaler T Zell Rezeptor Stimulation .....	32
<b>Abbildung 12</b> IFN- $\beta$ induziert Zelltod von OT-I $\text{CD8}^+$ T-Zellen .....	33
<b>Abbildung 13</b> Typ I IFN-Stimulation von $\text{CD8}^+$ T-Zellen inhibiert die Expression von IFN- $\gamma$ und Granzym B .....	35
<b>Abbildung 14</b> Typ I IFN vermindert die Expression der Todes-Liganden FasL und TRAIL .....	37
<b>Abbildung 15</b> Verringerte Zytotoxizität von $\text{CD8}^+$ T-Zellen nach IFN-Stimulation.....	38
<b>Abbildung 16</b> Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 nach TZR-Stimulation wird durch IFN-Stimulation nicht negativ beeinflusst .....	41
<b>Abbildung 17</b> Typ I IFN hat keinen Effekt auf die Expression der Aktivierungsmarker CD62L und CD25 .....	43
<b>Abbildung 18</b> Die Expression des Gedächtnis-Markers CD44 wird durch IFN-Stimulation nicht beeinflusst.....	44
<b>Abbildung 19</b> Verminderte IL-2 mRNA Induktion und Expression nach IFN-Stimulation ..	46

<b>Abbildung 20</b> IL-2 hebt die IFN-vermittelte Inhibition der Proliferation auf .....	47
<b>Abbildung 21</b> IFN- $\beta$ inhibiert den T-Zell-Rezeptor-vermittelten Kalzium Influx .....	50
<b>Abbildung 22</b> Unspezifische Ca <sup>2+</sup> -Mobilisierung durch Ionomycin wird durch Typ I IFN nicht beeinflusst.....	51
<b>Abbildung 23</b> IFN- $\beta$ führt zu verzögerter Kalzium-Mobilisierung aus intrazellulären Kalzium-Speichern.....	53
<b>Abbildung 24</b> Geringe Konzentrationen IFN- $\beta$ vermindern den T-Zell-Rezeptor-vermittelten Kalzium Influx .....	54
<b>Abbildung 25</b> Typ I IFN, aber nicht Typ II IFN führen zu verminderter Kalzium-Mobilisierung .....	55
<b>Abbildung 26</b> Unterschiedliche Dauer von IFN-Stimulationen hat verschiedene Effekte auf den T-Zell-Rezeptor-vermittelten Kalzium-Influx.....	56
<b>Abbildung 27</b> Einfluss von Typ I IFN auf die Phosphorylierung von Erk und p38 .....	58
<b>Abbildung 28</b> Einfluss von Typ I IFN auf die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$ und JNK .....	59
<b>Abbildung 29</b> Anzahl induzierter Gene nach IFN-, TZR- oder IFN-und TZR-Stimulation...	61
<b>Abbildung 30</b> Typ I IFN beeinflusst TZR-stimulierte Gene.....	62
<b>Abbildung 31</b> Typ I IFN inhibiert Geninduktion TZR-stimulierter Gene .....	65
<b>Abbildung 32</b> Typ I IFN inhibiert Gene des TZR-Signalweges .....	66
<b>Abbildung 33</b> Einfluss von TZR- und IFN-Stimulation auf bestimmte Anergie-Marker und Exhaustion-Marker.....	68
<b>Abbildung 34</b> IFN-stimulierte Gene, die durch eine TZR-Stimulation nicht beeinflusst werden .....	69
<b>Abbildung 35</b> IFN-induzierte Gene, die durch eine TZR-Stimulation stärker induziert werden .....	70
<b>Abbildung 36</b> Analyse von IFN-stimulierten Genen, die durch TZR-Stimulation herunterreguliert wurden.....	71
<b>Abbildung 37</b> Typ I IFN führen zu verminderter Aktivierung und Effektorfunktionen von <i>in vivo</i> stimulierten T-Zellen .....	74
<b>Abbildung 38</b> Eine kurzzeitige IFN-Stimulation hat keine langfristigen Auswirkungen auf T-Zellen.....	76

## 7.2 Abkürzungen

*	signifikant $p < 0,05$
**	signifikant $p < 0,01$
***	signifikant $p < 0,001$
7-AAD	7-Aminoactinomycin
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{L}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\alpha$	alpha
AAF	IFN- $\alpha$ activated factor
AP-1	Activator Protein-1
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-presenting cell
APS	Ammoniumpersulfat
ATF-1	Activating transcription factor-1
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$	beta
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CpG	Cytosin-phosphatidyl Guanin
CRAC	$\text{Ca}^{2+}$ -release activated $\text{Ca}^{2+}$ channel
CREB	cAMP response element binding
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CTL	zytotoxische T Lymphozyten
DAG	Diacylglycerol
DC	dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dsRNA	double-stranded RNA

EDTA	Ethylendiamintetraazid-Säure
EGTA	Ethylenglycoltetraazid-Säure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular signal-regulated Kinase
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FasL	Fas Ligand
FCS	Fötales Kälber-Serum
FITC	Fluorescein
FSC	Forward scatter
GADD	Growth arrest and DNA damage-inducible gene
GAF	IFN- $\gamma$ activated factor
GAP	GTPase aktivierende Proteine
GDP	Guanindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
IFN	Interferon
IFN- $\alpha$	Interferon-alpha
IFNAR	Typ I IFN Rezeptor
IFN- $\beta$	Interferon-beta
IFN- $\lambda$	Interferon-lamda
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IFNGR	Interferon- $\gamma$ Rezeptor
IKK-i	inducible I $\kappa$ B Kinase
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IRF	Interferon-regulatory factor
ISG	IFN-stimulated gene
ISGF	IFN-stimulated gene factor
ISRE	IFN-stimulated response element
ITAMs	Immunoreceptor tyrosine-based activation motives
i.v.	intravenös
Jak	Janus Kinasen
JNK	c-Jun terminal Kinase

L	Liter
Lag3	Lymphocyte activation gene 3
LCMV	Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	messenger RNA
NFκB	Nuclear factor kappa B
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NLS	Nuclear Localization Sequence
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	Programmed Cell Death-1
pDCs	plasmazytoide DCs
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat
PKC	Protein Kinase C
PKR	dsRNA-dependent protein kinase
PLC-γ1	Phospholipase C-γ1
PRR	Pattern recognition receptor
PTK	Protein Tyrosin Kinasen
qPCR	quantitative PCR
RIG-I	retinoic acid inducible gene-1
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RSV	Respiratory Syncitial Virus
RT-PCR	RealTime PCR



rpm	rotation per minute
s	Sekunde
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SOCS	Store-operated $\text{Ca}^{2+}$ entry
SSC	Sideward scatter
ssRNA	single-stranded RNA
STAT	Signal Transducer and Activation of Transcription
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TBK1	TANK-binding kinase-1
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRIF	Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN
TZR	T-Zell Rezeptor
U	Unit
Zap70	$\zeta$ -chain-associated protein kinase of 70kd

### 7.3 Danksagung

Ich möchte mich für die erhaltende Unterstützung bei dem Erstellen dieser Doktorarbeit bedanken.

Dr. Hansjörg Hauser möchte ich dafür danken, dass er mir ermöglichte diese Arbeit in der Arbeitsgruppe Genregulation und Differenzierung des Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung Braunschweig anzufertigen. Des Weiteren möchte ich mich für die vielen hilfreichen Anregungen, Kritiken und Diskussionen bedanken.

Bei Dr. Andrea Kröger möchte ich mich für die Betreuung meiner Doktorarbeit, die vielen Vorschläge und Hinweise und die kritische Lektüre meiner Doktorarbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich PD Dr. Gerhard Gross für die Übernahme der Mentorenschaft danken.

Martina Grashoff danke ich für die enorme Unterstützung bei der Anfertigung der Western Blots.

Zusätzlich möchte ich dem gesamten Labor D2.44 sowie dem Exil für die nette Zusammenarbeit danken.

Besonderer Dank gilt Antje und Ramya. Antje hat mir mit ihrem theoretischen und praktischen Wissen über die gesamte Dauer meiner Doktorarbeit zur Seite gestanden und hat sich immer die Zeit genommen, mit mir Probleme zu diskutieren. I wanna thank both, Ramya & Antje, for being really good colleagues and the nice time we spent together.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern und meinem Freund Thomas danken, da sie mich immer in jeder Hinsicht unterstützen. Vor allem Thomas möchte ich dafür danken, dass er meine Launen ertragen hat und mich immer wieder aufbaut.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Berit Neumann  
Dr.Jasper-Str.10  
06502 Timmenrode  
Geboren am 19.07.1983 in Blankenburg/Harz

### Schulbildung

1990-1994    Grundschule „Am Regenstein“  
1994-2003    Gymnasium „Am Thie“  
27.06.2003    Allgemeine Hochschulreife

### Studium

2003-2008    Studium der Biologie (Diplom) an der  
Technischen Universität Carolo Wilhelmina  
Braunschweig  
  
2007-2008    Diplomarbeit am Helmholtz-Zentrum für  
Infektionsforschung (HZI) Braunschweig,  
Thema: „Charakterisierung der stammzellen-  
abhängigen Bildung der extrazellulären Matrix“  
  
2008          Promotion am HZI Braunschweig, Thema:  
„Einfluss von Typ I IFN auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen“  
betreut durch Dr. Hansjörg Hauser und Dr.  
Andrea Kröger

### Publikationen

Shahab Osterloh S, Witte F, Hoffmann A, Laggies S, Neumann B, Seiffart V, Lindenmaier W, Gruber AD, Ringe J, Häupl T, Thorey F, Willbold E, Corbeau P, Gross G: Mesenchymal stem cell-dependent formation of heterotopic tendon-bone insertions (osteotendinous junctions). *Stem Cells* 2010, 28(9)

Ksienzyk A, Neumann B, Nandakumar R, Finsterbusch K, Grashoff M, Zawatzky R, Bernhardt G, Hauser H, Kröger A: IRF-1 expression is essential for natural killer cells to suppress metastasis, *Cancer Research* 2011, accepted

